Untersuchungen zur Regulation der Cholesterolsynthese in Rattenleber

Bernd Hamprecht

1960

Untersuchungen zur Regulation der Cholesterolsynthese in Rattenleber

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Bernd Hamprecht

München

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 2. 1968

Meiner Mutter

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545802_0005

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1964 bis September 1967 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen am Biochemischen Institut der Universität München ausgeführt.

Herrn Professor Dr. F. Lynen sage ich herzlichen Dank für das Interesse und die Unterstützung, die er meiner Arbeit und mir zuteil werden ließ.

Herrn W. Lippoldmüller danke ich für zuverlässige und konzentrierte Mitarbeit während der letzten beiden Monate meiner Versuche.

Mein Dank gilt ferner: Herrn Dr. P. Back für die Mitarbeit bei den Versuchen der Abbildungen 6,8 und 22; Herrn Dr. G. Binsch für die Einführung in die Fortran-Programmierung; Herrn Dr. W.Ch. Joo für die Destillation von MVLTMS und BTMSAA mit spezieller Hochvakuumtechnik, wodurch Analysen möglich waren; Herrn Dr. K. Rehn für β-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und β-Methyl-crotonsäureanhydrid; Herrn Prof. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer für Überlassung einer großen Zahl von Rattenkäfigen; Herrn F. Strohbusch für die Aufnahme der NMR-Spektren Abb. 36 und 42–44 und seine Hilfe bei der Abfassung des Algol-Programms; Herrn Dr. H. Vahrenkamp für die Aufnahme des NMR-Spektrums Abb. 39 und des IR-Spektrums Abb. 35; Herrn Dr. W. Zillig für die Eichkurve zur DNS-Bestimmung.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

II. Cholesterolsynthese in der Leber wiedergefütterter Ratten 7

1. Verfahren der HMG-CoA-Reduktase-Aktivitätsbestimmung 7

2. Versuche zum Leberschnittverfahren. 8

a) Inkubationsbedingungen 8

b) Lagerungszeit der kompakten Leber 9

c) Lagerungszeit der Leberschnitte in kaltem Puffer 10

d) Lagerung der Leberschnitte auf Filterpapier. 12

e) Bezugssysteme der Enzymaktivitäten. 14

f) Einfluß des Alters der Ratten auf die Enzymaktivität 16

g) Temperatureinfluß 20

3. Wiederfütterungsversuche unter Anwendung des Microsomentests. 21

4. Wiederfütterungsversuche unter Anwendung der Leberschnittmethode . . 23

a) Wiederfütterung mit kommerzieller Volldiät. 23

b) Wiederfütterung mit einseitigen Diäten. 25

c) Versuche zur Kenntnis des aktivierenden Faktors der kommerziellen Diät 30

d) Versuche zur Induktion der HMG-CoA-Reduktase. 33

III. Untersuchungen zur Chemie der Mevalonsäure 37

1. Kinetik der Lactonbildung aus MVS 38

2. Lage des Gleichgewichtes MVL/MVS. 47

3. Wassereliminierung aus MVL. 48

4. Mevalolactontrimethylsilyläther 54

IV. Verfahren zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität 57

1. Allgemeine Beschreibung des Verfahrens. 58

2. Radioaktivität der [5-^{14}C]-HMG-CoA-Lösung 58

3. HMG-CoA-Gehalt der [5-^{14}C]-HMG-CoA-Lösung. 64

4. Radiogaschromatographische Analyse der Ansätze zur Ermittlung der Reduktase-Aktivität 65

5. Eichung der gaschromatographischen Massenbestimmung von MVLTMS 68

6. Berechnung der spezifischen Aktivität der Reduktase 70

V. Eigenschaften der membrangebundenen HMG-CoA-Reduktase 74
1. Einflüsse der Inkubationspartner auf die Reduktase-Aktivität 74
2. Die Reduktase als "SH-Enzym" 81
3. Untersuchungen zum Fasteneffekt 83
4. Einfluß der Tageszeit auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in Rattenleber 90
5. Beständigkeit der microsomalen HMG-CoA-Reduktase 91
6. Versuch zur Ablösung der Reduktase von den Microsomen 92
VI. Wirkung von Gallensäuren auf die HMG-CoA-Reduktase 95
1. Hemmende Wirkung von Gallensäuren verschiedener Konzentration 95
2. Untersuchung über die Art der Gallensäurehemmung 97
3. Zur Reversibilität der Gallensäurehemmung 99
VII. Zusammenfassende Diskussion 103
VIII. Experimenteller Teil 111
1. Geräte 111
2. Chemikalien, Substrate, Enzyme 112
3. Ratten und Standarddiät 112
4. Zu Kapitel II (Cholesterolsynthese in der Leber wiedergefütterter Ratten) 113
a) Tierhaltung und Diäten 113
b) Leberschnittverfahren 115
c) Puromycinversuche 117
d) Statistische Berechnung 118
e) Angaben zu einzelnen Versuchen 119
5. Zu Kapitel III (Untersuchungen zur Chemie der Mevalonsäure) 121
a) Bestimmung des Gehaltes von MVL-Lösungen 121
b) Messung des MVL/MVS-Gleichgewichtes 122
c) Verlauf der MVL-Bildung, gaschromatographisch bestimmt 122
d) Wassereliminierung aus MVL 123
e) Darstellung von MVLTMS 124
f) Inkubation von MVL mit Diazomethan 125
6. Zu Kapitel IV (Verfahren zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität) 125
a) Darstellung von HMGDME und MGSDME 125

b) Darstellung von [5-^{14}C]-HMG-CoA 126
c) Bestimmung der Radioaktivität der [5-^{14}C]-HMG-CoA-Lösung 127
d) HMG-CoA-Gehalt 128
e) Aktivitätsbestimmung löslicher HMG-CoA-Lyase 129
f) Aktivitätsbestimmung der HMG-CoA-Reduktase 131
g) Gaschromatographische Analyse 132
h) Eichung der gaschromatographischen Massenbestimmung von MVLTMS 134
i) Bestimmung der Zählausbeute für ^{14}C in der Durchfluß-Szintillationszelle 134
j) ALGOL-Programm 135
7. Zu Kapitel V (Eigenschaften der membrangebundenen HMG-CoA-Reduktase) 140
a) Test auf microsomale HMG-CoA-Lyase 140
b) Jodacetamidhemmung 140
c) Untersuchungen zum Fasteneffekt 141
d) Stabilität 142
e) Versuch zur Ablösung der Microsomen 142
f) Angaben zu einzelnen Versuchen 143
8. Zu Kapitel VI (Wirkung von Gallensäuren auf die HMG-CoA-Reduktase) . 144
a) Reinheitsprüfung von Gallensäuren 144
b) Darstellung der konjugierten Gallensäuren 144
c) Inkubation der Reduktase mit Gallensäuren 146
d) Waschversuche an Microsomen 146
IX. Zusammenfassung 147
X. Literaturverzeichnis 149

Verwendete Abkürzungen:

BTMSAA	Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
CDOC	Chenodesoxycholat
CoA	Coenzym A
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DOC	Desoxycholat
dpm	Desintegrationen (Zerfälle) pro min
E	Einheit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FID	Flammenionisationsdetektor
HMDS	Hexamethyldisilazan
HMG	β-Hydroxy-β-methylglutaryl-
HMGA	β-Hydroxy-β-methylglutarat
HMG-CoA-Lyase	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Acetoacetat-Lyase (E.C.4.1.3.4)
HMG-CoA-Reduktase	Mevalonat : NADP Oxidoreduktase (CoA acylierend) (E.C.1.1.1.34)
HMGDME	β-Hydroxy-β-methylglutarsäuredimethylester
HMGS	β-Hydroxy-β-methylglutarsäure
Ipm	Impulse pro min
JAA	Jodacetamid
MGS	Methylglutaconsäure
MGSDME	Methylglutaconsäuredimethylester
MVA	Mevalonat
MVL	Mevalolacton
MVLTMS	Mevalolactontrimethylsilyläther
MVS	Mevalonsäure
NPGS	Neopentylglycolsuccinat
POPOP	1,4-Bis-2-(5-phenyloxazol)-benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
TC	Taurocholat
TCDOC	Taurochenodesoxycholat
TDOC	Taurodesoxycholat
TDSME	Tridecansäuremethylester
TMCS	Trimethylchlorsilan

TMS	Tetramethylsilan
TMS-	Trimethylsilierungs-
TPN	Triphosphopyridinnucleotid, oxydiert
TPNH	Triphosphopyridinnucleotid, reduziert
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T-RNS	Transfer-Ribonucleinsäure
TTMSMVA	Tris-(trimethylsilyl)-mevalonat
WLD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
ZT	Zimmertemperatur

I. Einleitung

Cholesterol ist das mengenmäßig bedeutendste Steroid der Tierwelt. Es wird in allen tierischen Geweben angetroffen: als Ester gesättigter und ungesättigter langkettiger Fettsäuren, in freier Form und als Schwefelsäurehalbester. Cholesterol ist Bestandteil der lipophilen Phasen des Körpers, nämlich der Zellmembranen und der Lipoproteine. Und aus Cholesterol stellt der tierische Organismus Gallensäuren und Steroidhormone her, Stoffe, die lebenswichtige Funktionen erfüllen. Im Zusammenhang mit krankhaften Erscheinungen im menschlichen Körper rückte Cholesterol ins Blickfeld der Forscher. Zunächst als "substance feuilleté, lamelleuse, brillante . . ." in Gallensteinen entdeckt (1), erweckte es andauernde Aufmerksamkeit, als man fand, daß Atherome der Arterienwände einen ungewöhnlich hohen Gehalt an Cholesterolestern besitzen (2). Dem aus Bilanzstudien gezogenen Schluß, daß der tierische Körper Cholesterol zu synthetisieren vermag (3-5), folgte nach Einführung der Isotopentechnik (6,7) die Aufklärung des biologischen Syntheseweges des Steroidgerüstes in den Arbeitskreisen von Lynen (8), Bloch (9), Popják und Cornforth (10) und Folkers (11). Damit war die Voraussetzung geschaffen, mit biochemischen Methoden Phänomene zu untersuchen, welche bedeuten, daß die Geschwindigkeit der Cholesterolsynthese vom Ernährungszustand der Versuchstiere abhängt.

Denn je weiter die Aufklärung der Zwischenstufen bei den Stoffwechselvorgängen fortschreitet, umso mehr kann sich das Augenmerk der Forschung der Regulation dieser Vorgänge in Mikroorganismen und Säugetieren zuwenden. D.h. man versucht herauszufinden, wie ein Organismus auf Überangebot oder Mangel an bestimmten Substanzen reagiert, sodaß sich für ihn unter den jeweiligen Umständen eine optimale Anpassung an die veränderte Situation ergibt. Ein großer Fächer von verschiedenen Anpassungsmöglichkeiten steht den Zellen zur Verfügung. Davon seien nur einige erwähnt.

1. Durch Erhöhung der Substratkonzentration steigen bei Enzymen mit großer Michaeliskonstante die Reaktionsgeschwindigkeiten stark an.
2. Substrataktivierung von Enzymen (das Substrat erniedrigt die Michaeliskonstante des Cofaktors; allosterische Effekte).
3. Substratinduzierte und endproduktreprimierte Biosynthese von Enzymprotein.

Diese Mechanismen können in gleicher Weise bei Ein- und Vielzellern wirksam werden. Hingegen besitzen höher organisierte Lebewesen, z.B. die Säugetiere, zusätzliche zentrale Steuerungsorgane (Nervensystem, Hormondrüsen), die in komplexem Zusammenspiel Stoffwechselvorgänge beeinflussen können, indem Hormone die Enzymbiosynthese in weit von ihrem Entstehungsort entfernten Zellen induzieren oder supprimieren.

Auch die Cholesterolsynthese im Wirbeltierorganismus paßt sich veränderten Lebensbedingungen an. Dabei verhalten sich die verschiedenen Gewebe allerdings unterschiedlich. Man weiß, daß praktisch alle Gewebe (12) und insbesondere Leber, Dünndarm, Haut (13) sowie Knochenmark (14) Cholesterol synthetisieren können.

Die meisten Arbeiten über Beeinflussung des Cholesterolstoffwechsels wurden an Leber ausgeführt, weil man bisher annimmt, daß die Leber die Hauptquelle des endogenen Serumcholesterols darstellt und daß sie den Serumcholesterolspiegel homöostatisch reguliert (15). Und wenn auch die kausale Verknüpfung noch ungeklärt ist, so gilt doch als erwiesen, daß ein hoher Serumcholesterolspiegel die Aussicht des Menschen, an Arteriosklerose zu erkranken, beträchtlich erhöht (16).

Bei Cholesterolfütterung geht die Geschwindigkeit der hepatischen Cholesterolsynthese aus Acetat stark zurück, wie von Gould und Taylor (17) erstmals an Kaninchen und Hunden in vivo und in vitro gezeigt wurde. Seither bestätigten viele Arbeitskreise diese Befunde an Ratten (18-22), Hühnern (23) und beim Menschen (24). Dabei konnten Frantz et al. (20) wahrscheinlich machen, daß die Cholesterolsynthesegeschwindigkeit in der Leber umso geringer ist, je mehr Cholesterol sie bereits enthält.

Hungern der Versuchstiere vermindert ebenfalls in hohem Maße die Fähigkeit der Leber, Cholesterol aus Acetat aufzubauen (22,25,26). Zum Unterschied von der Leber beeinflussen Cholesterolfütterung (27-31) und Hunger (13,30,31) die Cholesterolsynthese in der Dünndarmwand und anderen Geweben (30) kaum. Andererseits hemmt gerade die Galle, die die Hauptstoffwechselprodukte des Cholesterols, die Gallensäuren, enthält, die Cholesterolsynthese in den Cryptae der Dünndarmmucosa sehr stark, wie Siperstein und Dietschy (31) in Versuchen an lebenden Ratten zeigen konnten. Auch die Cholesterolsynthese aus Acetat in der Leber wird durch Gallensäuren beeinflußt. Verschiedene Autoren erzielten Hemmung durch Fütterung gallensaurer Salze (32-37). Oder sie zeigten, daß die Drainage des Gallenganges die Synthese von Cholesterol und Gallensäuren in der Leber emporschnellen läßt (38). Bloomfield (39) führte Bilanzstudien des

Steroidstoffwechsels an Ratten aus und fand, daß die Geschwindigkeit der Sterolsynthese proportional der fäkalen Gesamtsteroid-Ausscheidungsrate verläuft. Werden Cholesterol (40) oder Galle (38) aus dem Körper entfernt, so reagiert die Leber so, als sei ein Inhibitor der Cholesterolsynthese verlorengegangen.

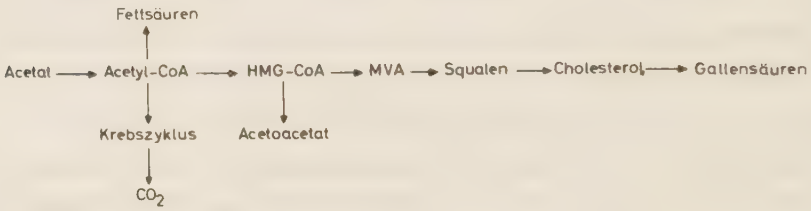
Auch die so erstaunliche Tritonstimulierung (21,22,41) der HMG-CoA-Reduktase soll in diesem Zusammenhang genannt werden. Zwar handelt es sich dabei nicht um ein in der Natur verwirklichtes Verfahren, den Cholesterolstoffwechsel zu beeinflussen. Jedoch könnte bessere Kenntnis der Einzelheiten dieses Vorganges wohl viel zum Verständnis der Regulation der Cholesterolsynthese im Organismus beitragen.

Schließlich stellte sich heraus, daß die Cholesterolsynthese in der Leber hormonell beeinflußt werden kann. Lebern hypophysektomierter Ratten haben fast vollständig ihre Fähigkeit verloren, Acetat in Cholesterol einzubauen (42), wohingegen – wie vielfach gezeigt wurde (43,44; und dort zitierte Literatur) – Thyroxingaben die Synthesegeschwindigkeit des Cholesterols in der Leber bedeutend erhöhen. Große Unterschiede zeigen sich auch hier zwischen den Organen, denn in Dünndarm und Nieren bleibt diese Wirkung des Thyroxins aus (43). Auch erhöhte körperliche Aktivität vergrößert in Rattenlebern den Aufbau von Cholesterol aus Acetat (45), möglicherweise indirekt über vermehrte Ausschüttung von Thyroidhormonen. In welch ursächlicher Verbindung damit die Beobachtung Nakamuras (46) steht, daß Leberschnitte im Dunkeln gehaltener oder blinder Ratten mehr Cholesterol aus Acetat synthetisieren als normale Kontrolltiere (Ratten sind im Dunkeln aktiv), wurde noch nicht untersucht.

Für das Verständnis der Regulation des Cholesterolstoffwechsels wäre es nun wichtig zu wissen, ob sich die genannten Regulationsvorgänge, die durch Cholesterol- bzw. Gallensäurefütterung, beim Hungern und nach Thyroidhormongaben ausgelöst werden, alle auf derselben Stufe des langen Syntheseweges vom Acetat zum Cholesterol abspielen. Bucher, Overath und Lynen (41) zeigten, daß beim Fasten die an die Lebermicrosomen gebundene HMG-CoA-Reduktase ihre enzymatische Aktivität praktisch vollständig verliert, d.h. die ohnehin schon langsame TPNH-abhängige Reduktionsreaktion von HMG-CoA zu Mevalonsäure:

$$\text{HMG-CoA} + 2\ \text{TPNH} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{MVS} + \text{CoA} + 2\ \text{TPN}^+ \qquad (1)$$

kommt zum Erliegen und damit auch die Cholesterolsynthese aus Acetat. Die HMG-CoA-Reduktasereaktion stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der gesammten Synthesekette dar (41). Sie ist gleichzeitig die erste Reaktionsstufe, die die Terpen- und Steroidsynthese nicht mehr mit einer anderen Synthesekette, der Ketogenese, gemeinsam hat (Abb. 1).



Das bedeutet aber, daß einerseits die Regulation der Ketogenese unabhängig von der Regulation der Cholesterolsynthese erfolgen kann (Voraussetzung ist ein genügend hoher HMG-CoA-Spiegel, sodaß HMG-CoA-Lyase und HMG-CoA-Reduktase nicht um das Substrat konkurrieren müssen, oder Konstanz der Lyase-Aktivität), andererseits aber bei Hemmung der Cholesterolsynthese nicht ein in keiner anderen Synthesekette verwertbares Zwischenprodukt entsteht und sich anhäuft.

Ein von Migicovsky in Lebermitochondrien gefundener Inhibitor hemmt die Cholesterolsynthese vor Mevalonat (47-50). Möglicherweise erniedrigt auch diese bislang noch nicht identifizierte Substanz die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität.

Auch die negative Feedback-Hemmung durch diätetisches Cholesterol greift nach Siperstein und Mitarbeitern an der HMG-CoA-Reduktase an (28,51,52). Allerdings soll das Cholesterol nicht selbst der Feedback-Inhibitor sein, sondern möglicherweise ein spezifischer β-Lipoprotein-Cholesterolkomplex (53).

Auf welche Weise Gallensäuren ihre eigene Entstehung aus Acetat hemmen, ist mehrfach zu erklären versucht worden. Beher et al. (36) schlugen einen doppelten Rückkopplungsmechanismus vor: Anhäufung von Gallensäuren in der Leber soll deren Bildung aus Cholesterol unterdrücken; der dadurch erhöhte Cholesterolspiegel verursache Hemmung der Cholesterolsynthese aus MVA. Da die Versuche der Autoren ungeeignet sind, Ergebnisse zur Stützung oder Widerlegung dieser These zu bringen, fehlt bislang der experimentelle Unterbau. Fimognari und Rodwell (54,55) berichten über die hemmende Wirkung von Gallensäuren auf den Einbau von Acetat in Leber-

homogenaten. Dieser Befund läßt die Möglichkeit zu, daß Gallensäuren die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität hemmen. Die Autoren berichten ferner (56), daß Desoxycholat kompetitiv Bakterienenzyme hemmt, die in Gegenwart von DPN und CoA Mevalonat dehydrieren. Diese Enzyme als Modelle für die Leber-HMG-CoA-Reduktase betrachtend, gelangen sie dann zu dem Schluß, Gallensäuren seien die Regulatoren der Cholesterolsynthese in Leber. Aus thermodynamischen Gründen können die Bakterienenzyme nicht durch Umkehrung der praktisch irreversiblen HMG-CoA-Reduktase-Reaktion aus Mevalonat HMG-CoA herstellen. Die Bakterienenzyme lassen sich somit nicht mit der HMG-CoA-Reduktase aus Hefe (57) oder Leber (41) vergleichen. Abgesehen davon, daß Gallensäuren keine Metabolite in diesen Bakterien sind, können somit die aus Versuchen mit den Bakterienenzymen erhaltenen Ergebnisse nicht auf die Verhältnisse in Leber übertragen werden. In Galle aus Gallenfistel-Ratten fanden Ogilvie und Kaplan (58) niedermolekulare Proteine, die in vitro die Cholesterolsynthese aus Acetat – nicht aber aus Mevalonat – stark hemmten. Auch hier wieder besteht die Möglichkeit, daß der Hemmstoff an der HMG-CoA-Reduktase angreift. Diese Befunde und die der Gallensäure-Fütterungsversuche erscheinen schwer vereinbar mit den Berichten, daß Gallengangligatur die Geschwindigkeit der hepatischen Cholesterolsynthese ansteigen läßt (59).

Da außerdem Guder (44) nachweisen konnte, daß die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase der Rattenleber vom Thyroidhormonspiegel abhängt, Nakamura (46) die Hell-Dunkel-Beeinflussung (s.o.) der Cholesterolsynthese bereits auf die Reaktionen vor MVA einschränken konnte und Kattermann, Reutter und Decker (60) dieselbe Eingrenzung möglich war für die Erhöhung der Cholesterolsyntheserate in der Leber aminonucleosidnephrotischer Ratten, sieht es so aus, als ob alle regulativen Einflüsse auf die Cholesterolsynthese in erster Linie an einem Enzym wirksam werden: der HMG-CoA-Reduktase.

Ziel vorliegender Arbeit war es, die Natur des oben genannten Fasteneffektes zu untersuchen. Es soll deshalb berichtet werden über:

a) Wiederfütterung von Hungerratten mit speziellen Diäten. Die Synthesegeschwindigkeit von Cholesterol aus Acetat wurde an Microsomen, vorwiegend aber an Leberschnitten untersucht.

b) Untersuchungen zur Chemie der Mevalonsäure als Ausgangsbasis für die Ent-

wicklung eines neuen Tests zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität.

c) Ein radiogaschromatographisches Verfahren zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität.

d) Untersuchungen zur Charakterisierung der microsomalen HMG-CoA-Reduktase aus Rattenleber.

e) Untersuchungen über den Einfluß von Gallensäuren auf die Aktivität dieser HMG-CoA-Reduktase.

II. Cholesterolsynthese in der Leber wiedergefütterter Ratten

Wenn Ratten Nahrungsentzug mit der weitgehenden Einstellung der hepatischen Cholesterolsynthese beantworten, so ist bei Wiederfütterung eine erneute Anpassung des Organismus an die veränderten Lebensbedingungen zu erwarten: Die Leber sollte mit der Zeit ihre Fähigkeit zur Cholesterolsynthese zurückerlangen. Versuche von Regen et al. (61) an Ratten, die mit kommerzieller Volldiät (Altromin R) wiedergefüttert wurden, bestätigten diese Vorstellung. Zunächst sollte nun untersucht werden, ob bereits gewisse Nahrungsbestandteile fähig sind, die durch Fasten verlorene HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wieder herzustellen.

Für dieses Studium der Reduktase benötigten wir ein Testverfahren. Es wird deshalb zunächst von diesen Testen die Rede sein, bevor über die Versuche zur Klärung obiger Fragen berichtet wird.

1. Verfahren der HMG-CoA-Reduktase-Aktivitätsbestimmung

Wie oben angeführt wurde, ist die HMG-CoA-Reduktase-Reaktion der Engpaß der Cholesterolbiosynthese aus Acetat. Folglich kann man ihre Aktivität testen, wenn man die Umwandlung irgend einer in der Reaktionsfolge vor Mevalonat stehenden Verbindung in irgend eine andere Verbindung mißt, die auf HMG-CoA folgt.

Die HMG-CoA-Reduktase aus Leber ist an die Microsomenmembranen gebunden, also kein lösliches Enzym (41). Ihre äußerst geringe Aktivität und andere TPNH-verbrauchende Enzyme in diesen Partikeln machen einen einfachen optischen Test zu ihrer Bestimmung unmöglich.

Am häufigsten wurde der Einbau von Acetat in Cholesterol in vivo oder besonders an Leberschnitten (62) oder Leberhomogenaten (63) untersucht. Den Einbau von ^{14}C-Acetat in Verbindungen zu messen, die in der Reaktionskette auf HMG-CoA folgen, aber noch vor Cholesterol liegen, stößt deshalb auf Schwierigkeiten, weil diese Stoffe in der intakten Zelle oder in Homogenaten rasch zu Cholesterol weiterreagieren. Wenn sie überhaupt isoliert werden können, ermöglicht ihre spezifische Radioaktivität keine quantitativen Rückschlüsse auf die Aktivität der Reduktase (nur unter anaeroben Bedingungen kann die Reaktionskette in Leberhomogenaten auf der Stufe des Squalens angehalten werden (63)). Will man die Folgereaktionen vermeiden, die die Anhäufung

einer bestimmten Verbindung, etwa Mevalonsäure, verhindern, so muß man die Enzyme ausschalten, die diese Reaktionen katalysieren; z.B. indem man sie abtrennt. Die membrangebundene Reduktase kann durch Zentrifugation von Mevalonatkinase und folgenden Enzymen getrennt werden. Bei der anschließenden Inkubation der Microsomenfraktion mit HMG-CoA und TPNH kann die Reaktion nicht über Mevalonsäure hinausschreiten. Nun müssen ^{14}C-HMG und ^{14}C-MVS getrennt werden. a) Nach Stoppen der Reaktion wird MVS mit Mevalonatkinase in Phosphomevalonsäure überführt und HMG durch Ätherperforation entfernt (57). b) HMG und MVS werden verestert und anschließend mit Hilfe der Radiogaschromatographie bestimmt (51,64). c) HMG und MVS werden an sauren Celitesäulen getrennt (61). In allen Fällen wird die spezifische Aktivität der isolierten Mevalonsäure ermittelt. Für diese Untersuchungen wurde anfänglich das (an anderer Stelle (61) ausführlich beschriebene) Verfahren von Regen verwendet.

2. Versuche zum Leberschnittverfahren

Da das von Regen (61) ausgearbeitete Verfahren sehr zeitraubend war, wurde der größte Teil der in diesem Kapitel zu berichtenden Versuche jedoch mit Leberschnittinkubationen ausgeführt. Um mit der Methode routinemäßig arbeiten zu können, waren noch eine Reihe möglicher Fehlerquellen zu überprüfen. Das ausgearbeitete Leberschnittverfahren und die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes werden im Experimentellen Teil (S. 115) beschrieben.

a) Inkubationsbedingungen

Substrat. Mit Leberschnitten einer normal ernährten Ratte wurde eine Substratsättigungskurve aufgenommen, um herauszufinden, wie hoch die Acetatkonzentration mindestens sein muß, damit die Reaktionsgeschwindigkeit maximal und damit von der Acetatkonzentration unabhängig wird (Abb. 2a).

Leberschnittmenge für den Inkubationsansatz. Es war schwierig, rasch genau 500 mg Leberschnitte einzuwiegen. Da aber in dieser Arbeit Versuchsergebnisse stets auf 500 mg Lebermenge bezogen werden sollten, um sie vergleichen zu können, war es wichtig zu erfahren, daß der Acetateinbau proportional zur Leberschnittmenge verlief (Abb. 2 b).

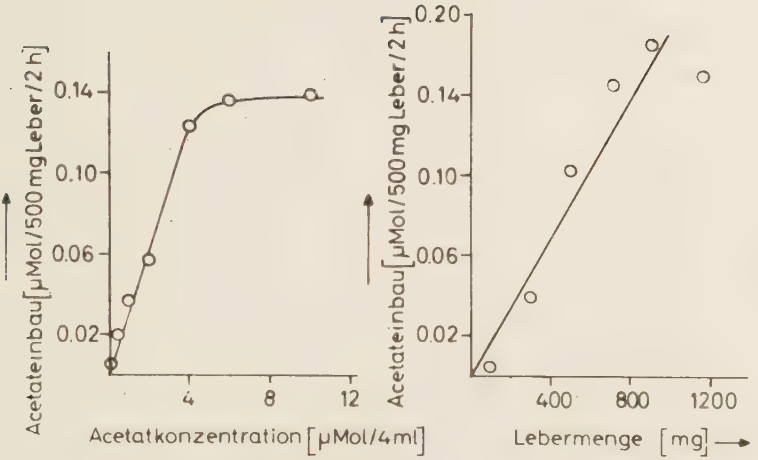


Abbildung 2

Abhängigkeit des Acetateinbaus in Cholesterol

a) von der Acetatkonzentration b) von der Lebermenge

b) Lagerungszeit der kompakten Leber

Die aus der soeben getöteten Ratte entfernte Leber wird in eiskalte Krebs-Ringer-Lösung (65) gelegt. Sofort anschließend wird mit der Herstellung der Leberschnitte begonnen. Dieser Vorgang nimmt, je nachdem wieviel Schnitte benötigt werden und wie gut die Schnitte gelingen, 20-60 min in Anspruch. Man darf erwarten, daß die zuerst erhaltenen Schnitte enzymatisch aktiver sind als die später hergestellten, da in der kompakten Leber der Sauerstoffmangel mit zunehmender Zeit immer stärkere Schädigungen der Zellen verursacht. Abb. 3 zeigt, daß gerade in der ersten Zeit nach Inkubationsbeginn der kompakten Leber deren Aktivität stark abnimmt. Es ist also wichtig für die Zuverlässigkeit der Versuche, die Leber möglichst rasch zu schneiden und die dafür benötigte Zeit möglichst konstant zu halten. Die Bereitung von 1g Leberschnitten (2 Inkubationen von je 500 mg) dauerte im allgemeinen ca. 20-30 min. Nehmen wir konstante Schnittleistung und die Kurvenstücke in Abb. 3 von t = 0 bis t = 30 min als Geraden an, so kann man sagen, daß sich die Summe der Schnitte so verhält, als seien alle gleichzeitig aus einer 15 min lang gelagerten Leber entstanden. In dieser Zeit nimmt die Aktivität der Leber um ca. 8% ab.

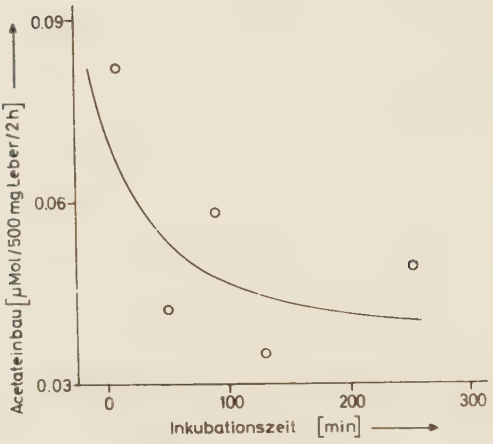


Abbildung 3

Abhängigkeit des Acetateinbaus in Cholesterol von der Inkubationszeit der kompakten Leber bei 0^0C.

c) Lagerungszeit der Leberschnitte in kaltem Puffer

Die frisch anfallenden Leberschnitte wurden in ca. 10 ml Krebs-Ringer-Lösung von 0^0C gesammelt. Wie bei der kompakten Leber erhob sich auch unter diesen Bedingungen die Frage nach der Desaktivierung mit zunehmender Lagerungszeit. Die Zeit wurde vom Beginn des Schneidens ($t = 0$) an gerechnet. Wie Abb. 4 zeigt, nimmt die Aktivität mit der Lagerungszeit rasch ab. Folglich mußte diese Inkubationszeit der Leberschnitte für alle Versuche möglichst konstant gehalten werden. Da aber die Herstellung der Leberschnitte nicht immer gleich schnell gelang, schwankte die Inkubationszeit der Leberschnitte bei 0^0C von ca. 30-40 min (20-30 min Herstellung der Schnitte, ca. weitere 10 min bis zum Inkubationsbeginn), was einer Aktivitätsschwankung von etwa 2% entspricht.

Während der Lagerung in Pufferlösung wurde ein Gemisch von 95% O_2/5% CO_2 mit einer Fritte eingeleitet, um die Zellen genügend mit Sauerstoff zu versorgen und den pH-Anstieg infolge CO_2-Verlust zu verhindern. Ein Versuch ohne Begasung (Abb. 4) zeigt, daß diese Befürchtung unbegründet ist. Denn der Abfall der Aktivität mit der Zeit entspricht völlig dem bei Begasung. Gestützt wird diese Beobachtung durch das Ergebnis eines viel später ausgeführten manometrischen Versuches, der zeigt, daß Le-

berschnitte bei 0^0C keinen Sauerstoff verbrauchen. Da aber auch keine schädliche Wirkung des Gases zu bemerken ist, wurde die Begasung vorsichtshalber beibehalten.

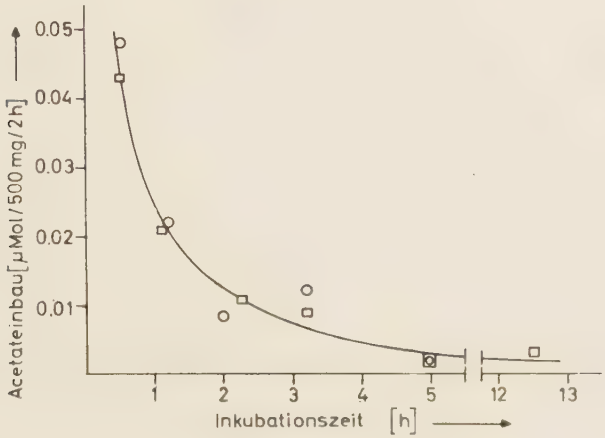


Abbildung 4

Abhängigkeit des Acetateinbaus in Cholesterol von der Vorinkubationszeit der Leberschnitte bei 0^0C.

o Begasung mit 95 Vol% O_2/5 Vol% CO_2; □ ohne Begasung

Um die Vermutung zu prüfen, daß diese Abnahme der enzymatischen Aktivität der Leberschnitte von einer Verringerung der Atmungsaktivität begleitet sein könnte, wurde an Leberschnitten wie im vorhergehenden Versuch nach verschiedenen Lagerungszeiten der Einbau von Acetat in Cholesterol bestimmt (Abb. 5a). Ferner wurde an Leberschnitten von Vergleichsratten die Veränderung der Atmungsgeschwindigkeit (O_2-Verbrauch) in Abhängigkeit von der Vorinkubation bei 0^0C gemessen (Abb. 5b). (Experimentelle Einzelheiten S.119). In beiden Fällen wurden nach halblogarithmischer Auftragung der Aktivitätswerte über der Zeit Geraden erhalten, aus denen sich die Halbwertszeit des jeweils beobachteten Aktivitätsschwunds bestimmen ließ. Sie beträgt für die Abnahme des Acetateinbaues in Cholesterol 100 min, für die Abnahme der Atmung 125 min; bei der Genauigkeit des Leberschnittverfahrens dürfte dieser Unterschied unbedeutend sein. Zur weiteren – hier nicht verfolgten – Aufklärung des Zusammenhangs zwischen Atmung und Cholesterolsynthese erschiene die Arbeitshypothese sinnvoll, daß die Ursache der Abnahme der Cholesterolsynthesegeschwindigkeit in einer Abnahme der Atmungsfähigkeit mit der Lagerungszeit zu suchen ist; zumal ein analoger

Zusammenhang auch für die Fettsäuresynthese in Rattenleber besteht (66).

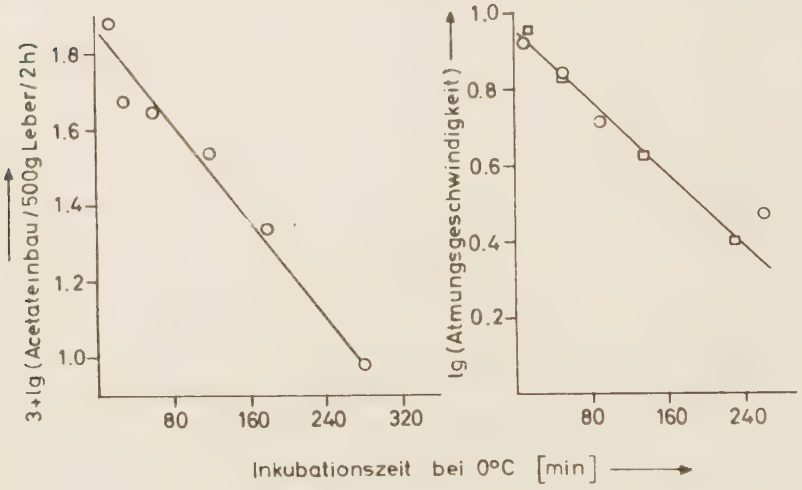


Abbildung 5a

Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Acetateinbaus in Cholesterol von der Lagerungszeit der Leberschnitte in Puffer von 0°C.

Jeder Wert ist das Mittel aus 3 Einzelwerten.

Abbildung 5b

Abhängigkeit der Atmungsgeschwindigkeit [µl O_2/100 mg Leber/min] der Leberschnitte von der Lagerungszeit in Puffer von 0°C.

○ Ratte A, □ Ratte B.

d) Lagerung der Leberschnitte auf Filterpapier

In der S. 116 gegebenen Beschreibung der hier angewandten Leberschnitt-Technik wird die Befreiung der Leberschnitte von stark wechselnden Mengen anhaftender Feuchtigkeit geschildert. Wie vermutet, leidet die Aktivität der Schnitte unter dieser Prozedur beträchtlich (Abb. 6). Der Wasserentzug läßt – vorausgesetzt, daß die Enzyme durch den Vorgang nicht desaktiviert werden – bei Verwendung immer gleicher Gewichtsmengen der Schnitte zum Einbauversuch eine erhöhte Bildung von Cholesterol aus Acetat erwarten. Denn mit abnehmendem Wassergehalt steigt die Zahl der Leberzellen (und damit die Zahl der Enzymmolekeln) pro Gewichtseinheit. Da aber eine Abnahme

der Aktivität beobachtet wird, müssen wir annehmen, daß das Enzymsystem durch die Lagerungsprozedur auf Filterpapier gelitten hat. Um die Versuchsergebnisse von der Masse der Einzelzelle unabhängig zu machen, müßte man die Ergebnisse der Enzymversuche auf die Zahl der pro Versuch eingesetzten Zellen beziehen. Der Zahl der Zellen proportional ist ihr DNS-Gehalt. Der DNS-Gehalt einer Zelle (genauer: pro Zellkern) ist von äußeren Einflüssen (Fasten, Erzeugung von Fettleber usw.) weitgehend unabhängig (67). Man verwendet also den DNS-Gehalt einer bestimmten Gewebemenge als Maß für die vorliegende Zahl der Zellen. Diese Vorstellungen lassen sich auf unseren Versuch übertragen. Von der auf Filterpapier ausgelegten Leber wurde ein Teil für den Inkubationsversuch, ein anderer für die DNS-Bestimmung nach Dische (68) verwendet. Die experimentellen Einzelheiten sind auf S. 120 angegeben.

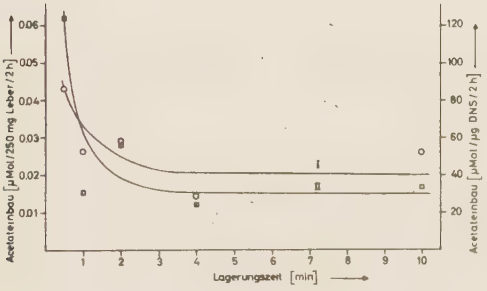


Abbildung 6

Abhängigkeit des Acetateinbaus in Cholesterol von der Lagerungszeit der Leberschnitte auf Filterpapier.

Beziehung der Werte auf Feuchtgewicht der Leberschnitte (Kurve I), auf deren DNS-Gehalt (Kurve II).

In Abb. 6 demonstriert Kurve I die Aktivität der Leberschnitte in Abhängigkeit von der Lagerungszeit auf Filterpapier, wobei die Enzymaktivitäten jeweils gleicher Gewichtsmengen der Schnitte betrachtet werden. Bei Kurve II aber werden die Enzymaktivitäten solcher Gewichtsmengen unterschiedlich wasserhaltiger Leberschnitte verglichen, die gleichen DNS-Gehalt besitzen. Kurve II fällt steiler ab als Kurve I. Das heißt, daß - nach dem eingangs Gesagten – die auf das Feuchtgewicht bezogenen Aktivitätswerte

(Kurve I) die Änderungen der Aktivitätsverhältnisse nicht mehr richtig wiedergeben. Denn der Abfall der Enzymaktivität wird teilweise kompensiert durch Erhöhung der Zahl der Zellen pro Gewichtseinheit.

Bei unseren Versuchen dauerte die Lagerung der Schnitte auf dem zweiten Filter ca. 3 min. Es gelang nicht, diese Zeit wesentlich zu unterbieten. Deshalb ist darauf zu achten, daß der Vorgang bei allen zu vergleichenden Experimenten möglichst konstant gehalten wird.

e) Bezugssysteme der Enzymaktivitäten

Die gemessenen Aktivitäten der HMG-CoA-Reduktase (µMol Acetat eingebaut in Cholesterol/2h) werden bei unseren Routineversuchen auf das Gewicht der eingesetzten feuchten Leberschnitte bezogen. Fragwürdig erscheint dieses Verfahren jedoch zunächst, wenn in einer Versuchsreihe Tiere unterschiedlichen Ernährungszustandes verglichen werden. Bei Hunger nimmt das Gewicht der einzelnen Leberzelle ab und damit steigt die spezifische Zellularität (Anzahl Zellen/g Gewebe) der Leber. Möchte man aber immer die enzymatische Aktivität derselben Anzahl Leberzellen verschiedener Tiere vergleichen, so muß man die Versuchsergebnisse auf den DNS-Gehalt beziehen. In Abb. 7 ist der Verlauf der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in der Leber mit der Wiederfütterungszeit 30 h lang gehungerter Ratten dargestellt. (Experimentelle Einzelheiten S. 120). Die Ergebnisse der Enzymaktivitätstests wurden sowohl auf das Feuchtgewicht der Leberschnitte (Kurve I) als auch auf deren DNS-Gehalt (Kurve II) bezogen. Da die Kurven sehr ähnlichen Verlauf zeigen, erscheint es als gerechtfertigt, die eingangs geäußerten Befürchtungen fallen zu lassen, bei derlei Fütterungsexperimenten auf die DNS-Bestimmung zu verzichten und die Enzymaktivitäten auf das Feuchtgewicht der Schnitte zu beziehen.

Bei einem anderen Wiederfütterungsexperiment wurde die spezifische Zellularität (DNS-Gehalt pro Gewichtseinheit Feuchtgewebe) nach 30stündigem Hungern verschieden lang wiedergefütterter Ratten bestimmt. Sie war unabhängig von der Wiederfütterungszeit, d.h. es war gleichgültig, ob ein Tier überhaupt nicht gefastet hatte oder nur 5 h wiedergefüttert worden war. Lediglich der Wert für das nicht wiedergefütterte Tier war 65% höher als alle übrigen; was auch mit dem Bericht von Thomson et al. (67), nach welchem der DNS-Gehalt pro Gewichtseinheit Rattenleber bei 48stündigem Fasten um ca. 50% zunimmt, gut übereinstimmt. Da aber die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität

gehungerter Tiere ohnehin beinahe null ist, ist es schließlich gleichgültig, worauf man bezieht. Die Ergebnisse werden also auch bei Wiederfütterungsversuchen durch Beziehung auf das Feuchtgewicht gegenüber der Beziehung auf den DNS-Gehalt nicht verzerrt.

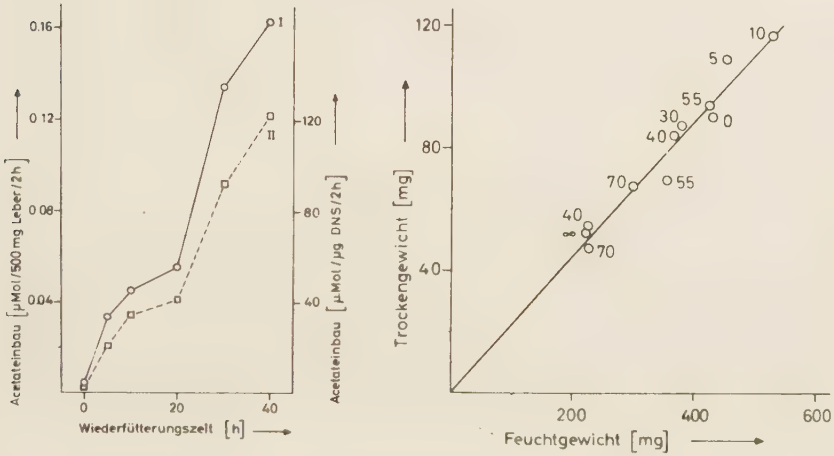


Abbildung 7

Acetateinbau in Cholesterol in Abhängigkeit von der Wiederfütterungszeit.

Beziehung der Aktivitätswerte auf das Feuchtgewicht der Schnitte (Kurve I), auf den DNS-Gehalt (Kurve II).

Abbildung 8

Zusammenhang zwischen Feucht- und Trockengewicht der Leberschnitte.

Die Zahlen an den Meßpunkten geben die Wiederfütterungszeit der Hungerratten in Stunden an. ∞ bedeutet: nicht gefastete Ratte.

Die Resultate der Enzymtests können auch auf das Trockengewicht der Leberschnitte bezogen werden. Bei einem Wiederfütterungsversuch an Hungerratten wurde festgestellt, daß Feucht- und Trockengewicht von Leberschnitten, die durch wiederholte Lagerung auf Filterpapier – wie auf S.116 geschildert – von anhaftender Feuchtigkeit befreit worden waren, einander proportional sind (Abb. 8). (Nähere Einzelheiten siehe im Experimentellen Teil, S. 120). Die Verwendung des Trockengewichtes in dieser

Phase des Versuchsablaufes bringt also keine Vorteile. Jedoch dürfte sie bei der vorhergehenden ersten Lagerung auf Filterpapier günstig sein. Die zweite Lagerung auf Filterpapier, nur erforderlich, weil die Mengen anhaftender Feuchtigkeit nach der ersten Lagerung von Fall zu Fall noch zu stark wechselten, kann durch eine Trockengewichtsbestimmung an einem aliquoten Teil der einmalig ausgelegten Schnitte ersetzt werden. Man bezieht die Enzymaktivitäten dann auf das Trockengewicht. Bei diesem Verfahren werden die Schnitte schonender behandelt, was nach Abb. 6, S. 13, leicht einzusehen ist. Die solcherart erhaltenen Werte der Abb. 5b, S. 12, sprechen für die Vorzüge dieser Alternativmethode.

f) Einfluß des Alters der Ratten auf die Enzymaktivität

Während der Versuche wurden erstens wegen Lieferschwierigkeiten des Rattenzüchters und zweitens, weil manchmal große Lebern benötigt wurden (um möglichst viele Einzelmessungen an einer Leber vornehmen zu können) Ratten unterschiedlichen Gewichts verwendet (80-300 g). Hängt die enzymatische Aktivität dieser Lebern bei der Schnittinkubation vom Lebendgewicht der Tiere (und damit vom Alter) ab? Abb. 9 zeigt, daß die Aktivität mit zunehmendem Gewicht (Alter) der Tiere stark absinkt. (Experimentelle Einzelheiten S. 120).

Um HMG-CoA-Reduktase-Aktivitätswerte, die an Ratten verschiedenen Lebendgewichtes gemessen wurden, miteinander vergleichen zu können, wurden alle Werte auf 100-g-Ratten umgerechnet. Dazu diente die rechte Skala in Abb. 9, die die Enzymaktivität einer Ratte vom Gewicht G als Bruchteil der Aktivität einer Ratte vom Gewicht G = 100g angibt. Abb. 9 wurde als Eichdiagramm verwendet.

Es erscheint vernünftig anzunehmen, daß die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität mit der Wachstumsgeschwindigkeit des Tieres in engem Zusammenhang steht. Denn zum Aufbau der Zellmembranen wird Cholesterol benötigt.

In Abb. 10 sehen wir Wachstumskurven, die das Körpergewicht zweier Ratten in Abhängigkeit von der Zeit wiedergegeben. "Glättet" man diese Kurven, so kann man mit ihrer Hilfe die Enzymaktivitäten in Abb. 9 über dem Lebensalter der Tiere auftragen, also die Variable Gewicht G eliminieren und erhält Abb. 11. Unter der Annahme, daß die beiden Kurven in Abb. 10 für alle im Versuch verwendeten Tiere gelten (diese Voraussetzung gilt bereits für die Umzeichnung Abb. 9-11), kann man die Wachstumsgeschwindigkeiten v der Tiere zum Zeitpunkt des Todes ermitteln.

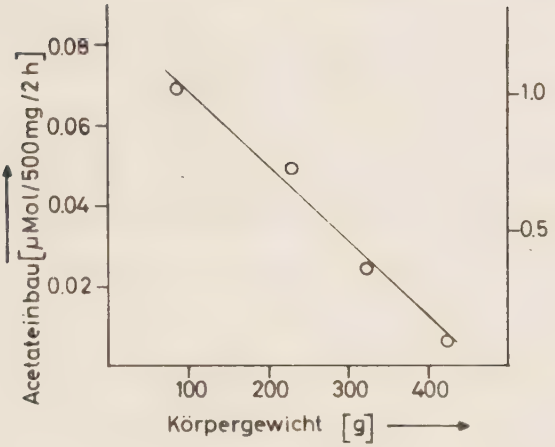


Abbildung 9

Acetateinbau in Cholesterol in Abhängigkeit vom Körpergewicht der Ratten.

Rechte Skala: siehe Text

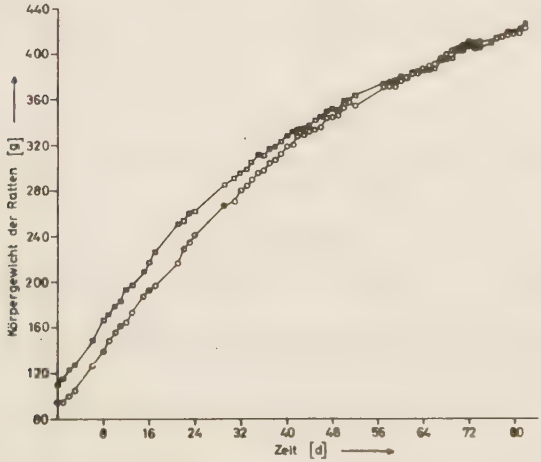


Abbildung 10

Wachstumskurven zweier männlicher Ratten.

Futter: Altromin R

Man legt dazu die Tangenten an die beiden Wachstumskurven (Abb. 10) in den Punkten, die den Gewichten der Versuchstiere entsprechen, und mittelt jeweils zwischen den aus beiden Kurven abgelesenen Zeitwerten und Tangentensteigungen; letztere stellen die gesuchten Wachstumsgeschwindigkeiten v dar (Dimension Gewicht/Zeit [g/d]). Sie sind in Abb. 12 über dem zugehörigen Zeitwert aufgetragen. Wir haben somit Enzymaktivität A (Abb. 11) und Wachstumsgeschwindigkeit v (Abb. 12) als Funktion der Zeit dargestellt. Wir benötigen jetzt nur noch ein sinnvolles Verfahren, um den Parameter Zeit eliminieren zu können.

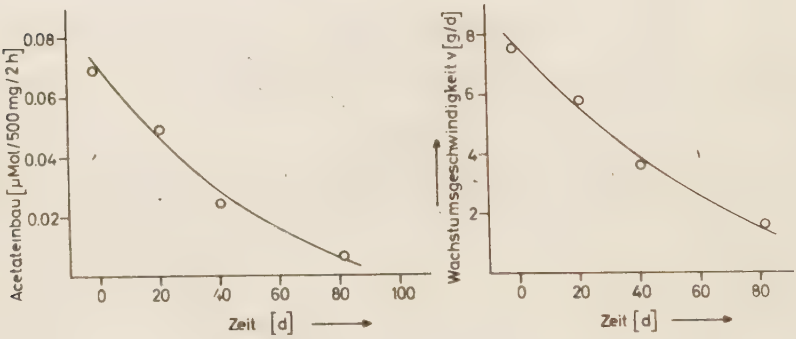


Abbildung 11

Acetateinbau in Cholesterol in Abhängigkeit von der Wachstumszeit der Ratten.

Abbildung 12

Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der Wachstumszeit.

Dazu nehmen wir an, daß die Enzymaktivität mit der Lebenszeit organisch abnimmt (Abb. 11) und stellen dies dar in der Formel

$$A = f(t) = C \cdot e^{-kt} \qquad (2)$$

(A = Enzymaktivität, t = Zeit; C und k sind Konstanten). Ferner nehmen wir an, daß die Wachstumskurven sich asymptotisch einem Endwert G_∞ nähern, wenn $t \to \infty$ geht (Abb. 10). Solche Wachstumserscheinungen haben die Form

$$G = g(t) = G_\infty (1 - e^{-lt}) \qquad (3)$$

(G = Gewicht des Tieres zur Zeit t; G_∞ = Gewicht des Tieres bei $t = \infty$; l ist eine Konstante). Die Wachstumsgeschwindigkeit v ist dann

$$v = \frac{dG}{dt} = l \cdot G_\infty \cdot e^{-lt} \tag{4}$$

Logarithmieren wir die Gleichungen (2) und (4):

$$\ln A = -kt + \ln C \tag{5}$$

$$\ln v = -lt + \ln (l \cdot G_\infty) \tag{6}$$

Wir eliminieren t aus (5) und (6) und erhalten:

$$\ln A = \frac{k}{l} \cdot \ln v - \frac{k}{l} \cdot \ln (l \cdot G_\infty) + \ln C \tag{7}$$

Wir schreiben für $\frac{k}{l} = a$ und fassen die beiden letzten konstanten Glieder zur neuen Konstanten b zusammen:

$$\ln A = a \cdot \ln v + b \tag{8}$$

Waren unsere beiden eingangs gemachten Annahmen richtig, dann muß sich eine Gerade ergeben, wenn man die Logarithmen der Enzymaktivitäten über denen der zugehörigen Wachstumsgeschwindigkeiten aufträgt. Dies ist in Abb. 13 für die Ratten der Abb. 9, S. 17, geschehen. Die Punkte liegen tatsächlich auf einer Geraden.

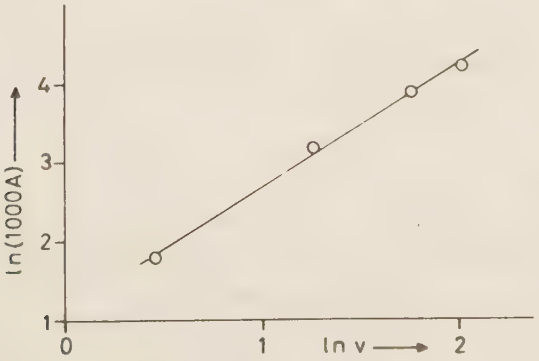


Abbildung 13

Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Wachstumsgeschwindigkeit

Die Richtigkeit der Annahmen ist damit nicht bewiesen; aber es ist auch nicht sehr wahrscheinlich, daß sie unberechtigt waren. Der Haupteinwand gegen diese Betrachtung dürfte sein, daß sie angestellt worden ist, obwohl nur eine kleine Zahl von Tieren (neun) für den Versuch verwendet wurde.

Die Gerade in Abb. 13 besagt, daß in demselben Maße, in dem sich das Wachstum der Tiere verlangsamt, auch die Enzymaktivität abnimmt. D.h. die Aktivität des Schlüsselenzyms der Cholesterolsynthese richtet sich nach den Bedürfnissen des Organismus. Daraus lassen sich keine Schlüsse über den Mechanismus der Wachstumsregulation ziehen. Handelt es sich bei der Verringerung der Enzymaktivität mit zunehmendem Alter um eine Abnahme der Enzymkonzentration in der Zelle, oder ändert sich die Zahl der HMG-CoA-Reduktasemolekeln nicht mit dem Alter und wird vielmehr ein Hemmstoff wirksam? Da sich diese Aktivitätsänderungen in langen Zeiträumen abspielen (aus Abb. 11, S. 18, läßt sich für das Enzym eine "Halblebenszeit" – sozusagen 2. Ordnung – von etwa 24 Tagen bestimmen), ist man versucht, an eine Regulation auf der Ebene der Proteinbiosynthese zu denken. Klären müßten Experimente.

Solche Altersabhängigkeit der Cholesterolsynthesegeschwindigkeit wurde in vivo an Ratten bereits früher beobachtet (69,70); Bloch et al. (62) waren bei Versuchen mit Leberschnitten darauf aufmerksam geworden, ohne den Effekt jedoch näher zu untersuchen. Auch wurde berichtet, daß die Cholesterolsynthese aus Acetat (aber auch aus Mevalonat) in Aortenwänden von Hühnern mit zunehmendem Lebensalter stark zurückging, nicht aber die CO_2-Bildung aus Acetat (71).

g) Temperatureinfluß

Da der zur Verfügung stehende Tierraum nicht thermostatisiert war, kam es an heißen Tagen vor, daß die Temperatur den Normalwert von 23-24°C beträchtlich überschritt und auf 27°C kletterte. Den Einfluß der Raumtemperatur auf die Cholesterolsynthese aus Acetat kennenzulernen, erschien deshalb wünschenswert. Abb. 14 zeigt, daß in einem weiten Bereich die Cholesterolsynthese in Rattenleberschnitten unabhängig von der Temperatur ist, bei der die Ratten zuvor 3-4 Tage gehalten worden waren.

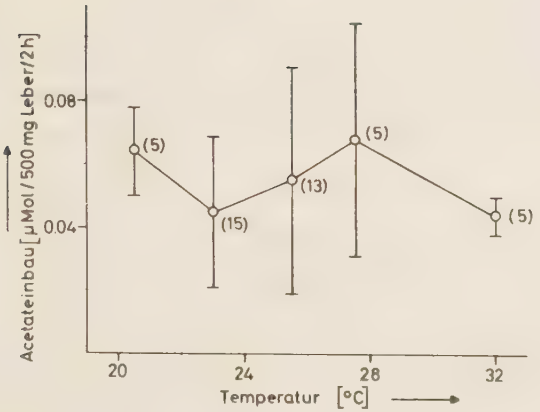


Abbildung 14

Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Cholesterolsynthese aus Acetat von der Raumtemperatur, bei der die Tiere zuvor gehalten wurden.

Bei jedem Punkt ist die Standardabweichung angegeben. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Ratten an, die für einen Wert eingesetzt wurden.

3. Wiederfütterungsversuche unter Anwendung des Microsomentests [1)]

Um die oben aufgeworfene Frage zu beantworten, ob bestimmte Nahrungsbestandteile allein schon in der Lage sind, die HMG-CoA-Reduktase bei Hungerratten zu reaktivieren, wurden zunächst die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen angestellt.

17 h lang gehungerte Ratten erhielten durch Tubusfütterung oder ad libitum während 10 h bis zu ihrem Tod eine der zu untersuchenden Nahrungen: a) Proteine, b) Kohlenhydrate, c) gesättigte Fette, d) ungesättigte Fette, e) kommerzielle Rattendiät. Die Lebermicrosomenfraktion dieser Tiere wurde nach Regen et al. (61) auf HMG-CoA-Reduktase-Aktivität untersucht. Dazu wurde nach Inkubation mit ^{14}C-HMG-CoA und TPNH, Zusatz von Träger-MVA und Hydrolyse der CoA-Verbindungen mit Lauge MVL an sauren Celitesäulen von HMGS getrennt. Die spezifische Radioaktivität des Lactons ist ein Maß

[1)] Diese Versuche wurden großenteils in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. David M. Regen und Fräulein Christl Riepertinger ausgeführt. Siehe auch (61).

für die Enzymaktivität. Die gefundenen Aktivitäten werden in Tab. 1 verglichen mit Werten, die in gleicher Weise an 17 h gefasteten, immer mit kommerzieller Rattendiät und immer mit kommerzieller Rattendiät + 2% Cholesterolzusatz gefütterten Ratten erhalten wurden. Die Tabelle enthält die Ergebnisse dieser Parallelversuche (I-III).

Tabelle 1

Umwandlung von ^{14}C-HMG-CoA zu MVA durch Lebermicrosomen verschieden gefütterter Ratten [a)]

Behandlung			Umwandlung von ^{14}C-HMG-CoA zu MVA µµMol/mg Microsomenprotein/min		
Laufende Nr.	vorausgehende Fastenzeit h	Futter	I	II	III
1	17	-	29	17	7
2	0	Altromin	50	-	68
3	0	Altromin + Cholesterol [b)]	33	21	67
4	17	Altromin	33	48	27
5	17	Kohlenhydrate [b)]	29	-	17 [c)]
6	17	Proteine [b)]	23	68	10 [c)]
7	17	ungesättigte Fette	35 [c)]	77 [c)]	64 [c)]
8	17	gesättigte Fette	80 [c)]	67 [c)]	19 [c)]

Anmerkungen:

a) Experimentelle Einzelheiten zum Test siehe Regen et al. (61).

b) Die Herstellung der Diäten wird nicht angegeben.

c) Magentubusfütterung (Experimenteller Teil, S. 115).

Man sieht, daß mit diesen Versuchen keine eindeutigen Resultate erzielt wurden; z.T. widersprechen die Ergebnisse einander. Lediglich bei Hungerratten findet man die erwartete (22,25,26) niedrige Aktivität. Auf eine eingehende Diskussion der Meßwerte möchte ich daher verzichten und vielmehr die experimentellen Faktoren beleuchten, die geeignet sind, die an einen solchen Versuch geknüpften Erwartungen zu dämpfen: 1) Nur eine Ratte wurde pro Einzelexperiment verwendet. Die dadurch bedingten statistischen Schwankungen sind erheblich. 2) Bei einem Teil der Versuche wurde – wie aus der Tabelle ersichtlich – die Applikationsweise der Nahrung von einem Experiment zum nächsten verändert (ad libitum; Schlundsonde). Zwangsfütterung mit der Schlundsonde bedeutet aber einen Stresszustand für das Tier, dessen Einfluß durch Kontrollversuche berücksichtigt werden müßte. 3) Die Zusammensetzung der Kohlenhydrat- und Proteindiäten war in verschiedenen Versuchen geändert worden, teils um die Viskosität der Nahrung für die Tubusfütterung möglichst niedrig zu halten. 4) Die Nahrungen passierten den Verdauungstrakt verschieden rasch. Ein beträchtlicher Teil der zwangsverfütterten öligen Fette wurde schnell wieder unverdaut ausgeschieden. 5) Die Wiederfütterungszeit von 10 h war möglicherweise zu kurz, als daß sich klare Effekte bereits hätten zu erkennen geben können.

4. Wiederfütterungsversuche unter Anwendung der Leberschnittmethode

a) Wiederfütterung mit kommerzieller Volldiät

Die Berücksichtigung dieser Faktoren führte zu Versuchen mit einer größeren Zahl von Tieren (Wiederfütterungszeiten von wenigen Stunden bis zu vier Tagen) und zu Diäten, die ad libitum verabreicht werden konnten. Das wegen der langwierigen Celitechromatographie zeitaufwendige Microsomenverfahren mußte durch das einfachere Leberschnittverfahren ersetzt werden, da mit einer großen Zahl von Versuchen zu rechnen war.

Damit bei allen verwendeten Tieren die Cholesterolsynthese in der Leber zum Erliegen kommt, muß man nach Bucher, Overath und Lynen (41) Ratten 24 h fasten lassen. Für die hier beschriebenen Versuche wurden, um sicher zu gehen, 30 h gewählt. Nach dieser Zeit hat nämlich das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht ein plateauartiges Minimum erreicht (72). Danach wurden die Tiere mit den verschiedenen auf ihre aktivierende Wirkung zu untersuchenden Diäten gefüttert, jeweils ein Tier nach 0, 5, 10,

20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 h Wiederfütterung geschlachtet und die HMG-CoA-Reduktase-Aktivitäten in der Leber bestimmt.

Zunächst wurde mit der kommerziellen Volldiät Altromin R wieder gefüttert. Aus Abb. 15, Kurven I und II, ist ein fast linearer Anstieg der Aktivität in den ersten 30 h zu ersehen. In der folgenden Zeit (Kurve II) werden die Aktivitätsänderungen geringer, die Kurve scheint in ein Plateau überzugehen. Die Microsomenexperimente (Tab. 1, S. 22) deuteten an, daß möglicherweise Wiederfütterung mit Fetten die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität besonders rasch ansteigen ließe. Statt Fütterung mittels Magentubus wurde den Hungertieren ein mit zusätzlichen 10% Maiskeimöl angereichertes Altromin angeboten. Dem lag die Vorstellung zugrunde, daß Maiskeimöl nicht nur in reiner Form, sondern auch dann eine besondere Wirkung haben müsse, wenn es in einer Diät in reichlichen Mengen enthalten wäre. Die Kurven III und IV in Abb. 15 widerlegen diese Hypothese. Weder bewirkt der Fettzusatz zu Altromin einen rascheren Anstieg der Aktivität noch werden nach längeren Wiederfütterungszeiten höhere Aktivitätswerte erreicht. Allen vier Kurven ist ein rascher Anstieg gemeinsam. Die Werte dieser Kurven, bei den einzelnen Zeiten verglichen, streuen – außer bei 10 h, was Zufall sein mag – relativ stark. Damit wären die mit den Microsomenexperimenten erhaltenen starken Schwankungen bei mehrfacher Wiederholung der Wiederfütterung mit derselben Diät wahrscheinlich auf statistisch verteilte individuelle Unterschiede zwischen den Tieren (bezüglich ihrer Regenerierungsgeschwindigkeit der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität) zurückzuführen.

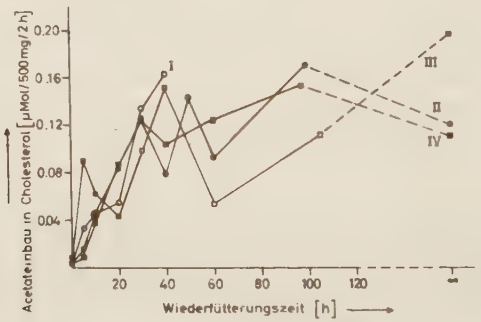


Abbildung 15

Abhängigkeit des Acetateinbaus in Cholesterol von der Wiederfütterungszeit gefasteter Ratten.

Kurven I und II: Fütterung mit Altromin. Kurven III und IV: Fütterung mit Altromin, das 10% Maiskeimöl enthielt.

Den Kurven II-IV ist ferner gemeinsam, daß sie nach 30-40 h ein plateauartiges Maximum erreicht haben, wobei allerdings beträchtliche Schwankungen der Aktivitätswerte von Tier zu Tier auftreten. Besonders deutlich wird dies an den Vergleichsratten, die ohne vorausgehende Fastenperiode über viele Tage mit Altromin, bzw. mit Altromin + 10% Mazolaöl, gefüttert waren.

Die Ursache dieser Schwankungen ist nicht erwiesen. Wahrscheinlich spielen – neben statistischen Schwankungen – die tageszeitlichen Unterschiede der Reduktase-Aktivität bei den dauernd gefütterten Kontrolltieren und den längere Zeit wiedergefütterten Tieren eine Rolle. Sie wurden nämlich nicht zu denselben Tageszeiten geschlachtet. Untersuchungen der Einbaugeschwindigkeit von Acetat in Cholesterol zu verschiedenen Tageszeiten hatten ergeben, daß die Cholesterolsynthese nachts um ein Vielfaches schneller verläuft als am Tage, daß also ein deutlicher Tag- und Nachtrhythmus besteht (37).

b) Wiederfütterung mit einseitigen Diäten

Nach Wiederfütterungsversuchen mit Altromin wurden die einzelnen Hauptbestandteile der Nahrung: Kohlenhydrate, Proteine, gesättigte und ungesättigte Fette auf ihre Fähigkeit zur Reaktivierung der während der Fastenperiode fast verschwundenen HMG-CoA-Reduktase-Aktivität untersucht. Dazu wurden den Ratten Nahrungen gereicht, die pro Gramm Trockengewicht stets dieselbe Zahl verwertbarer Kalorien enthielten. Nach (73) beträgt der Energiebedarf von Ratten 3,1-3,7 kcal/g Futter. Die bei vorliegenden Versuchen verwendeten Nahrungen wurden auf 3,5 kcal/g eingerichtet. Dabei wurde für die Berechnung der Zusammensetzung der Diäten 9 kcal/g für Fette, 4 kcal/g für Kohlenhydrate und Proteine zugrunde gelegt (74). Als Füllstoff wurde Zellulosepulver verwendet. Außerdem enthielten die Diäten Vitamin- und Nährsalzzusätze. Zusammensetzung der Diäten, der Vitamin- und der Salzmischungen werden im Experimentellen Teil, S. 113 beschrieben.

Wiederfütterung mit Kohlenhydratdiät: 30 h gehungerte Ratten wurden mit einer halbsynthetischen reinen Kohlenhydratdiät (Diäten C bzw. D, S. 114) bis zu 90 h wiedergefüttert. Abb. 16 stellt das Ergebnis zweier Versuche dar. Kohlenhydrate zeigen also unter diesen Bedingungen nur eine schwach stimulierende Wirkung auf die HMG-CoA-Reduktase, wie aus dem Vergleich mit den beiden Kontrollwerten für Altromin-gefütterte Ratten (ohne vorausgehende Fastenperiode) zu ersehen ist.

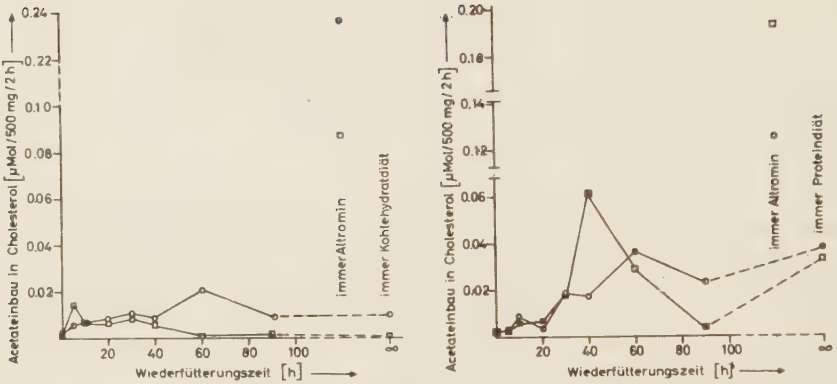


Abbildung 16 und 17

Abhängigkeit des Acetateinbaus in Cholesterol von der Wiederfütterungszeit gehungerter Ratten.

○ Versuch 1; □ Versuch 2

Abbildung 16 Wiederfütterung mit Kohlenhydratdiät

Abbildung 17 Wiederfütterung mit Proteindiät

Auch bei Tieren, die über mehrere Tage ohne Fastenperiode mit Kohlenhydratdiät gefüttert wurden, ergaben sich keine höheren Aktivitätswerte als bei Tieren, die mit dieser Diät 90 h lang wiedergefüttert wurden.

Wiederfütterung mit Proteindiät: Abb. 17 zeigt zwei analoge Versuche an Ratten, die mit reiner Proteindiät (Diäten E bzw. F, S. 114) wiedergefüttert wurden. Der Aktivitätsanstieg ist zwar beträchtlich größer (Faktor 3) als bei Kohlenhydratfütterung, liegt aber immer noch weit unter den Werten, die mit Altromin erreicht werden.

Wiederfütterung mit Maiskeimöldiät (vorwiegend ungesättigte Fette) nach der Fastenperiode (Diät G, S. 114) bringt keinen Aktivitätsanstieg, wie beide Versuche, Abb. 18, übereinstimmend aussagen.

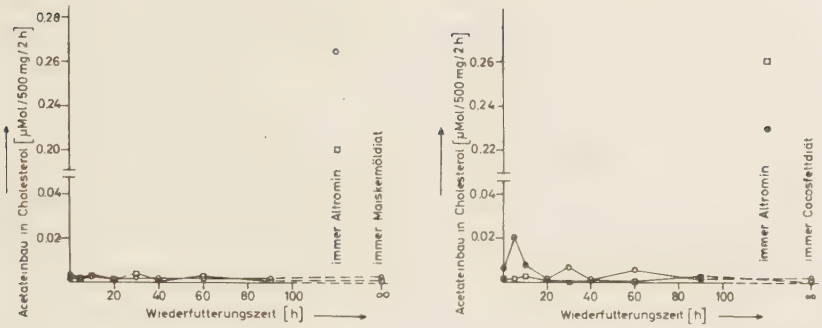


Abbildung 18 und 19

Abhängigkeit des Acetateinbaus in Cholesterol von der Wiederfütterungszeit gehungerter Ratten.

○ Versuch 1; □ Versuch 2

Abbildung 18 Wiederfütterung mit Maiskeimöldiät

Abbildung 19 Wiederfütterung mit Cocosfettdiät

Wiederfütterung mit Cocosfettdiät (vorwiegend gesättigte Fette): Die in Abb. 19 dargestellten Ergebnisse zweier Wiederfütterungsversuche mit reiner Cocosfettdiät (Diät H, S. 114) unterscheiden sich wenig. Die Aktivitätswerte von Versuch I liegen geringfügig über denen des Versuches II. Auch gesättigte Fette wirken somit nicht rekonstituierend auf die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität.

Keine der vier verschiedenen einseitigen Diäten kommt Altromin in seiner stimulierenden Wirkung auf die HMG-CoA-Reduktase auch nur annähernd gleich. Die bei Altrominfütterung sich einstellenden Aktivitäten liegen um den Faktor 3 bis 100 über denen, die bei Verabreichung der einseitigen Diäten gefunden werden. Am ehesten noch sind Proteine einer Stimulierung fähig, Kohlenhydrate kaum, gesättigte und ungesättigte Fette überhaupt nicht mehr.

Wurde ohne vorangehende Hungerperiode 9 bis 10 Tage lang eine halbsynthetische Nahrung gereicht, die alle diese Bestandteile in der auf S. 114 zu ersehenden Menge enthielt, so betrugen bei zwei Versuchen, die parallel zu obigen Wiederfütterungsexperimenten ausgeführt wurden, die Aktivitäten 0,014 (Rattengewicht: 174 g) bzw. 0,029 (Rattengewicht: 148 g) [µMol Acetat eingebaut in Cholesterol/500 mg Leber/2 h]. Sie waren also von derselben Größe, wie sie nur mit Protein wiedergefütterte Tiere ergaben.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen die Angaben von Tomkins und Chaikoff (26). Sie finden, daß nicht nur Proteine, sondern auch Kohlenhydrate und Maiskeimöl fähig sind, die durch eine künstliche Diät – analog Diät B (S. 114) – hervorgerufene Geschwindigkeit des Acetateinbaus in Cholesterol wiederherzustellen, wenn sie Hungerratten während 24 h per Magentubus verabreicht werden.

Ein partieller Hungereffekt der Art, daß die Tiere die Diäten bei Wiederfütterung nicht gefressen hätten, kann nicht der Grund für die großen Unterschiede gegenüber Altromin sein. Denn bis zu 20 h Wiederfütterungszeit wiesen alle Tiere prall gefüllten Magen und Dünndarm auf. Bei längeren Fütterungszeiten war die Füllung meist nicht mehr so groß. Doch wurde stets – auch bei den mit einseitigen Diäten ohne vorhergehendes Fasten gefütterten Tieren – Nahrung im Verdauungstrakt gefunden. Die tägliche Futteraufnahme wurde allerdings nicht bestimmt. Viele der Tiere bekamen nach 1-2-tägiger Fütterung mit den pastenartigen halbsynthetischen Diäten (S. 114) Durchfälle. Weglassen der Gelatine in den Diäten A und E erhöhte die Konsistenz der Faeces nicht sonderlich. Da aber auch Tiere mit unter diesen Bedingungen weniger ausgeprägtem oder fehlendem Durchfall niedrige Reduktase-Aktivitäten zeigten, scheint der Durchfall nicht die Ursache der gegenüber Altromin verringerten Werte zu sein.

Die Ratten wachsen mit den verschiedenen Diäten der Tab. 21, S. 114 sehr unterschiedlich. Bei jüngeren (80-150g) und einem Teil der älteren (200-350 g) Ratten unterscheiden sich Altromin und semisynthetische Volldiät (Tab. 21, S. 114), ohne vorheriges Fasten verabreicht, nicht in ihrer Wirkung auf das Wachstum; manche ältere Tiere jedoch wachsen mit Altromin erheblich schneller als mit der semisynthetischen Diät. Die Ursache dafür kann nicht in der für die Tiere neuen Form der Nahrung (pastenartige Masse) liegen, da fein pulverisiertes, mit Wasser zu einer Paste angerührtes Altromin den Altrominpastillen in seiner Wirkung auf das Wachstum nicht nachsteht. Vielleicht spielen Unterschiede in Farbe und Geruch der Nahrungen bei älteren Tieren eine bedeutendere Rolle. Wird die Proteindiät E gefüttert, so verlangsamt sich zwar das Wachstum gegenüber Altrominfütterung; die Tiere nehmen aber nicht ab, wie bei Fütterung mit den übrigen einseitigen Diäten gefunden wurde (Abb. 20).

30 h Fastenperiode und Wiederfütterung bedeuten für die Ratten einen Einbruch in den normalen Wachstumsprozeß, den sie ca. 3 Tage nach Wiederfütterungsbeginn vollständig ausgeglichen haben. Die Tiere nehmen während der Fastenperiode rasch um ca. 15% ihres Körpergewichtes ab; in den ersten 20 h der Wiederfütterungszeit fressen sie

dann große Mengen des vorgesetzten Futters, ihr Gewicht steigt sprungartig an. Danach aber ähneln die Gewichtskurven mit fortschreitender Zeit immer mehr denjenigen normal ernährter Tiere (siehe Abb. 10, S. 17). Abb. 21 veranschaulicht diese Vorgänge.

Es ergeben sich also Parallelen zwischen den Aktivitäten und den Gewichtsveränderungen der Tiere bei der Widerfütterung mit den einseitigen Diäten C-H (Tab. 21, S. 114). Denn sehr niedrige Aktivität stellt sich bei Gewichtsabnahme (Kohlenhydrat- bzw. Fettfütterung), höhere Aktivität bei Gewichtszunahme (Proteinfütterung) ein.

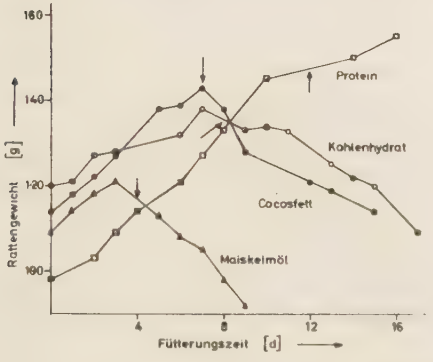


Abbildung 20

Wachstumskurven von Ratten, die mit einseitigen Spezialdiäten ernährt wurden (keine Fastenperiode).
Pfeile: Ende der Altrominfütterung, Beginn der Fütterung einseitiger Spezialdiäten.

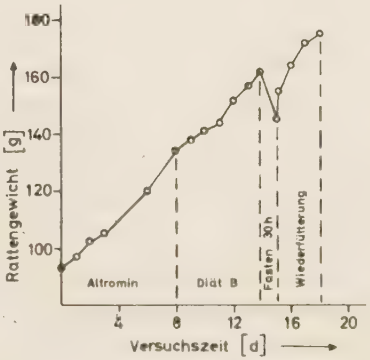


Abbildung 21

Zeitliche Veränderung des Körpergewichtes einer Ratte bei einem typischen Wiederfütterungsexperiment.

Auch in Abb. 13 (S. 19) war eine Zunahme der Reduktase-Aktivität mit der Wachstumsgeschwindigkeit gezeigt worden. Selbst wenn man diese Beziehung verallgemeinerte und – hypothetisch – auf alle Vorgänge anwendete, bei denen verringerte Wachstumsgeschwindigkeit und erniedrigte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität parallel gehen, könnte sie allein die geschilderten diätbedingten Unterschiede der Aktivität nicht erklären. Somit wäre dieselbe Aktivität bei Tieren zu erwarten, die auf verschiedenen Diäten gleich schnell wachsen; also etwa für junge Ratten, die mit Altromin bzw. halbsynthetischer Volldiät gefüttert wurden. Dies ist aber, wie auf S. 27 gezeigt wurde, nicht der

Fall. Was ist also der Grund für den unterschiedlichen Einfluß der drei Diätgruppen: (I) Altromin; (II) halbsynthetische Volldiät B, sowie Proteindiät E und F; (III) Kohlenhydrat- und Fettdiäten C und D bzw. G und H (Tab. 21, S. 114) auf die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität? Die Diäten der Gruppe (II) unterscheiden sich von denen der Gruppe (III) durch das Vorhandensein von Protein. Dieses ist für das Wachstum unentbehrlich. Bei längerem Proteinmangel tritt Verarmung an wichtigen Enzymen ein, vielleicht auch an HMG-CoA-Reduktase. Oder es tritt ein anderer Mechanismus (Feedback-Regulation) in Tätigkeit, der die Cholesterolsynthese an den augenblicklichen Bedarf des Tieres anpaßt. Da aber – wie Abb. 20 zeigt – Proteinmangel das Wachstum verhindert, wird auch weniger Cholesterol benötigt.

c) Versuche zur Kenntnis des aktivierenden Faktors der kommerziellen Diät

Die Senkung der Einbaugeschwindigkeit von Acetat in Cholesterol auf nahezu null durch Fasten besteht also anscheinend aus zwei Schritten. Der kleinere von beiden rührt von Proteinmangel her, der größere hat vermutlich andere Gründe. Denn Proteinmangel kann nicht die Ursache für die unterschiedliche Wirkung von Altromin und semisynthetischer Diät B (bzw. Proteindiät E,F) sein, da alle Protein (essentielle Aminosäuren) in ausreichender Menge enthalten.

Wir stellten uns deshalb vor, Altromin müsse einen Faktor besitzen, der die Cholesterolsynthese beschleunigt und der in den proteinhaltigen halbsynthetischen Diäten (B,E,F) fehlt. Da Carroll (75) berichtet hatte, daß der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren für einen Teil der stimulierenden Wirkung des kommerziellen Futters auf die Cholesterolsynthese aus Acetat (gegenüber semisynthetischer Diät) verantwortlich sei, wurde die semisynthetische Diät B mit einem Petrolätherextrakt aus Altromin versetzt. Besonders in Linolsäure vermutete Carroll den aktivierenden Bestandteil des Fettes. Durch Zusatz von 10% Maiskeimöl (über 50% der Fettsäuren sind Linolsäure) hatte seine semisynthetische Diät die aktivierende Wirkung der kommerziellen Diät erreicht. Somit wurden obengenannte Diät, sowie folgende andere Futter jeweils 5 Hungerratten angeboten: Altrominrückstand nach Petrolätherextraktion; Rekombination Petrolätherextrakt/Petrolätherextraktionsrückstand; Diät B + 10% Mazolaöl; Diät B + wäßriger Extrakt aus Altromin; Diät B + dialysierter wäßriger Extrakt aus Altromin; Altrominrückstand nach wäßriger Extraktion; Rekombination wäßriger Extrakt und zugehöriger Extraktionsrückstand; Diät B; Altromin; Altromin im Heißdampfsterilisator 2 h auf

120^0 erhitzt. Es zeigte sich, daß sich weder der Aktivitätswert für Diät B noch der irgend einer der anderen Diäten von dem für Altrominfütterung erhaltenen Wert signifikant unterschied. Die Streuung der Meßwerte innerhalb einer Gruppe war erheblich. Sie verringerte sich auf die Hälfte, wenn die Aktivitätswerte auf 100 g schwere Ratten umgerechnet wurden (was als weiterer Hinweis dafür gewertet wird, daß die Alterskorrektur nicht unberechtigt ist).

Damit kann der Carrollsche Befund (75), daß Fütterung halbsynthetischer, mit Maiskeimöl versetzter Diät den Einbau von Acetat in Cholesterol erhöht, nicht bestätigt werden. Allerdings fütterte Carroll seine Tiere (ohne Fastenperiode) 10-19 Tage mit den zu untersuchenden Diäten; die Ratten vorliegender Versuche wurden nur 4 Tage wiedergefüttert. Eine aktivierende Wirkung des Petrolätherextraktes oder des wäßrigen Extraktes aus Altromin auf die Diät B ist in diesem Versuch nicht mehr zu erwarten gewesen, da sich bereits Diät B und Altromin in ihrer Wirkung auf die Cholesterolsynthese nicht unterschieden. Der Grund dafür ist noch unbekannt; frühere Versuche (S. 25 ff) hatten ja große Unterschiede erkennen lassen.

Die soeben geschilderten Befunde bringen somit keine Klärung der Frage, warum Leber aus Ratten, die mit einer kommerziellen Diät ernährt wurden, pro Zeiteinheit mehr Cholesterol aus Acetat synthetisieren als Lebern aus Tieren, die semisynthetische Diät erhielten. D.h. die Natur des Altrominfaktors (S. 30) bleibt ungeklärt.

Schon früher beobachteten andere Arbeitskreise diesen unterschiedlichen Effekt der beiden Diätarten (32,76). Portman et al. (77-79), Coleman und Baumann (80) und Bloomfield (39) stellten fest, daß Fütterung von kommerzieller Diät und von Diäten mit hohem Fasergehalt eine wesentliche Steigerung der faekalen Gallensäureexkretion verursachen. Werden Gallensäuren nicht im Darm resorbiert, so werde die Leber zu stark erhöhter Gallensäureausscheidung angeregt; der erhöhte Gallensäureverlust aber stimuliere die Cholesterolsynthese in der Leber kräftig, wie Myant und Eder berichten (38). Bei der Interpretation dieser Versuche (38) muß man aber berücksichtigen, daß man Galle nicht gleich Gallensäuren setzen darf (58). Es liegt somit nahe, die stimulierende Wirkung kommerzieller Diät auf die Cholesterolsynthese mit erhöhter Gallensäureausscheidung in Zusammenhang zu bringen, derart, daß mit den Gallensäuren ein Inhibitor der Cholesterolsynthese entfernt wird. Hinzu kommt, daß erhöhte Gallensäureausscheidung von einem Anstieg der faekalen Cholesterolausscheidung begleitet wird (77), da Gallensäuren für die Resorption des Cholesterols im Dünndarm notwendig sind (81). Cholesterolverlust des Organismus hat eine erhöhte

Cholesterolsynthese zur Folge (40).

Die Cholesterol- und Gallensäurenausscheidung erhöhende Wirkung der kommerziellen Diät kann imitiert werden: Man füttert in halbsynthetischer Diät Anionenaustauscher (82,83). Mit der erhöhten faekalen Steroidexkretion sinkt der Plasmacholesterolspiegel. Verknüpfte man diese Arbeiten gedanklich mit den Untersuchungen von Myant und Eder (38), so war zu erwarten, daß Fütterung von Anionenaustauscher die Cholesterolsynthese in der Leber beschleunigte. Nach Beimischung des Austauschers zu halbsynthetischen Diäten der Art B (S. 114) wurde auch mit halbsynthetischer Diät eine hohe Cholesterolsynthesegeschwindigkeit erreicht, wie sie sonst nur mit Altromin erzeugt werden konnte (37,84).

Proteinmangel scheint nur einen Teil des Fasteneffekts auszumachen, einen anderen der verringerte Entzug von Sterolen aus dem enterohepatischen Kreislauf. Denn das hungernde Tier scheidet nur noch wenig Faeces aus. Verfütterung des Anionenaustauschers in einer Diät, die sonst nur aus Cellulosepulver und Nährsalzen bestand, sollte dann einen starken Anstieg der Cholesterolsynthese in der Leber von Hungerratten verursachen. Da die Tiere die Diäten nicht fraßen und Tubusfütterung des Austauschers Schwierigkeiten bereitete, konnte der Versuch nicht durchgeführt werden. Die Untersuchungen zur Funktion der Gallensäuren bei der Regulation der Cholesterolsynthese wurden mit anderen Methoden fortgesetzt. Sie werden deshalb in Abschnitt V besprochen.

Hill et al. (85) fütterten fettfrei ernährte Tiere per Magentubus mit gesättigten Fetten und fanden eine Stimulierung der Cholesterolsynthese. Sie konnten beweisen, daß dieser Anstieg nicht auf eine Erhöhung des Acetyl-CoA-Vorrats infolge Feedback-Hemmung der Fettsäuresynthese beruht. Andere (86-88) beobachteten an Leberschnitten und in vivo nach Verabreichung ungesättigter Pflanzenfette ebenfalls eine Steigerung der Synthesegeschwindigkeit von Cholesterol aus Acetat. Aber während all dieser Experimente wurde den Tieren neben Fett immer auch Protein in ausreichender Menge angeboten (im Gegensatz zu unseren Versuchen). Es fehlt in der Literatur (89) nicht an Erklärungsversuchen für die Wirkung der ungesättigten Fette auf die Cholesterolsynthese. Aber die endgültige Klärung steht noch aus.

d) Versuche zur Induktion der HMG-CoA-Reduktase

Abb. 17 (S. 26) gibt die zeitliche Zunahme der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wieder, wenn 30stündig gefastete Ratten mit einer einseitigen Proteindiät wiedergefüttert werden. Bereits 1960 hatte Lynen vermutet (41), daß während der Fastenperiode die HMG-CoA-Reduktase abgebaut wird. Dadurch könnte das Verschwinden der Aktivität dieses Enzyms ebensogut erklärt werden wie durch das Auftreten eines Inhibitors oder den Verlust eines Aktivators. Und Wiederaufleben der Enzymaktivität bei Wiederfütterung könnte dann nur durch De-novo-Synthese des Enzymproteins verursacht worden sein.

In ähnlicher Weise wie Verfütterung von Proteindiät an Fastentiere die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wieder auftreten läßt, erscheint bei proteinverarmten Ratten nach Caseinhydrolysatgaben die Aktivität der Threonindehydratase (E.C.4.2.1.16) wieder (90). Erhalten die Tiere bei Beginn der Wiederfütterungsperiode Puromycin, so unterbleibt der Anstieg der Threonindehydratase-Aktivität; wird Puromycin erst 12 h später injiziert, so ändert sich der Aktivitätsspiegel des Enzyms in den folgenden 12 h nicht mehr wesentlich, insbesondere steigt die Aktivität nicht mehr weiter wie bei Abwesenheit von Puromycin. Puromycin hemmt wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit zum aminosäuretragenden Ende der Aminoacyl-T-RNS (91) das Wachstum des Polypeptidstrangs bei der Proteinbiosynthese.

Um zu prüfen, ob das geschilderte Wiedererscheinen der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität einer De-novo-Synthese des Enzyms zu verdanken ist, wurde der Enzyminduktionsversuch von Pitot und Peraino (90) wiederholt. Dazu erhielten die Tiere 5 Tage lang eine im wesentlichen aus Glucose und 2% Casein bestehende Proteinmangeldiät (92) in Pastillenform, fasteten über Nacht und wurden dann zu den Zeiten t = 0, 6, 12, 18 h mittels Schlundsonde mit 3 ml einer 33%igen wäßrigen Caseinhydrolysatlösung gefüttert. Andere Gruppen von Tieren erhielten zusätzlich bei t = 0, 4, 8 h 10 mg Puromycindihydrochlorid/100 g Körpergewicht. Geschlachtet wurde bei t = 0, 6, 12, 18, 24 h. Ein Teil jeder Leber wurde zu Schnitten verarbeitet und in bekannter Weise auf seine Fähigkeit zur Cholesterolsynthese aus Acetat untersucht. Der Rest der Leber, der zur Bestimmung der Threonindehydratase-Aktivität diente, wurde nach Pitot und Peraino (90) aufgearbeitet und nach Holzer et al. (93) getestet (weitere exptl. Einzelheiten S. 117). Abb. 22a demonstriert das Ansteigen der Threonindehydratase-Aktivität mit der

Zeit (obere Kurve) und die Hemmbarkeit dieses Vorgangs durch Puromycin (untere Kurve), Abb. 22b ähnliche Verhältnisse für die HMG-CoA-Reduktase.

Dieser Versuch bestätigt die Befunde von Pitot und Peraino (90) über die Induzierbarkeit der Threonindehydratase und gibt Hinweise dafür, daß auch die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität nach Fasten bei Wiederfütterung deshalb ansteigt, weil neues Enzymprotein synthetisiert wird. In einem Wiederholungsversuch mit einer größeren Zahl von Tieren wurde auf die Beobachtung der Threonindehydratase-Aktivität verzichtet und lediglich der Acetateinbau in Cholesterol bestimmt (Abb. 23). Der Anstieg der Aktivität ist geringer als in Abb. 22b und nach 12 h bereits abgeschlossen (Versuch ohne Puromycin). Folglich ist auch der erreichte Endwert der Aktivität sehr viel niedriger als in jenem Versuch. Die Werte bei 12 h und 18 h (Versuch ohne Puromycin) streuen sehr stark.

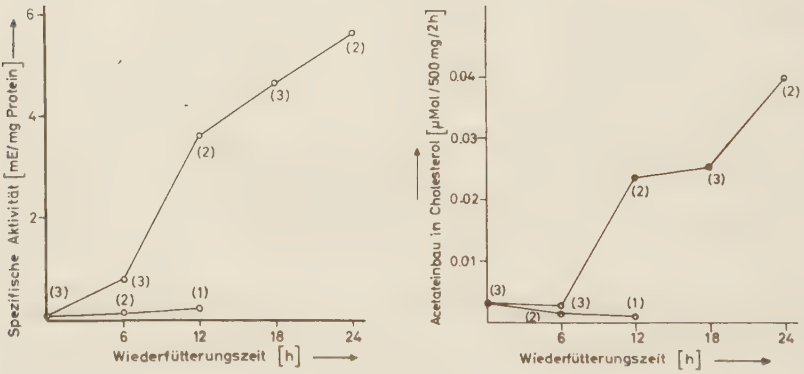


Abbildung 22

Abhängigkeit der Enzym-Aktivität von der Zeit, während der Protein-verarmte Ratten mit Caseinhydrolysat wiedergefüttert wurden.

obere Kurve: ohne Puromycin; unter Kurve: mit Puromycin.
Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl Ratten pro Meßpunkt an.

Abbildung 22a Threonin-Dehydratase

Abbildung 22b HMG-CoA-Reduktase (Einbau von Acetat in Cholesterol)

Vom Kontrollwert (keine Wiederfütterung) und den 6- und 12-h-Werten bei Applikation von Puromycin unterscheidet sich der Wert bei 18 h (ohne Puromycin) signifikant, die 24-h-Werte (ohne und mit Puromycin) hochsignifikant; alle anderen Werte sind nicht

signifikant voneinander verschieden. Das bedeutet, daß die Wiederfütterung mit Caseinhydrolysat tatsächlich einen Aktivitätsanstieg verursacht. Im Wiederfütterungsversuch mit ad libitum gewährter Proteindiät (Abb. 17, S. 26) war ebenfalls ein deutlicher Aktivitätsanstieg mit der Zeit zu bemerken, sodaß die Ergebnisse beider Versuche einander stützen. Puromycingaben vom Beginn der Wiederfütterung an verhindern den Aktivitätsanstieg, was den mit einer geringeren Zahl von Ratten erhaltenen Befund bestätigt. Dieser Schluß wird gezogen, obwohl sich die mit und ohne Puromycin erhaltenen Werte bei 6 und 12 h (Abb. 23) nicht signifikant unterscheiden. Die Populationen der Werte ohne Puromycin enthalten aber eine beträchtliche Anzahl von Werten einer Höhe, wie sie unter den bei Puromycingabe erhaltenen überhaupt nicht auftreten (die bei den Punkten der Abb. 23 angegebenen Standardabweichungen veranschaulichen diese Tatsache gut). Der Beobachtung, daß die Aktivität nicht weiter ansteigt, wenn von 12 h Wiederfütterungszeit an Puromycin gespritzt wird, kommt deshalb kaum Bedeutung zu, weil dies auch ohne Puromycin bereits der Fall ist. Immerhin verursacht die Puromycingabe im Zeitraum von 12-24 h kein Absinken der Aktivität auf den Kontrollwert (0 h).

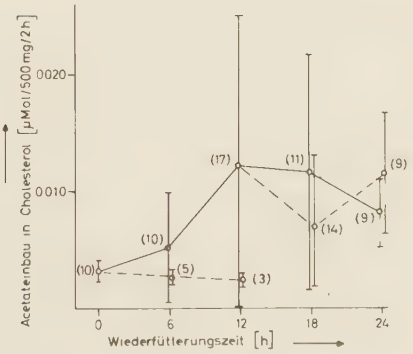


Abbildung 23

Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Acetateinbaus in Cholesterol von der Zeit, während der proteinverarmte Ratten mit Caseinhydrolysat wiedergefüttert wurden.

—— ohne, - - - mit Puromycin. Bei der zweiten gestrichelten Kurve (12-24 h) wurde Puromycin erst ab 12 h Wiederfütterungszeit verabreicht. Bei jedem Meßpunkt ist die Stichprobenstreuung und die Zahl der verwendeten Ratten (in Klammer) angegeben. Exptl. Einzelheiten S. 118 .

Warum die Stichprobenstreuung der meisten Werte (Abb. 23) so außergewöhnlich groß ist und die Aktivität nach 12 h nicht weiter ansteigt, ist unbekannt. Ferner muß betont und bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden, daß die Tiere, die Puromycin erhielten, heftigen Durchfall bekamen und einen äußerst kranken Eindruck erweckten; einige starben während des Versuchs.

Diese Ergebnisse sind keinesfalls ein Beweis dafür, daß die HMG-CoA-Reduktase-Molekel bei Wiederfütterung neu synthetisiert wird. Sie schließen diese Möglichkeit lediglich nicht aus. Die Beweisführung würde die Erfüllung einer Reihe von Kriterien erfordern (94). Die dazu nötigen Versuche wurden schon deshalb nicht unternommen, weil dazu vollständig gereinigte HMG-CoA-Reduktase aus Leber benötigt wird, das Enzym jedoch noch nicht gereinigt wurde.

III. Untersuchungen zur Chemie der Mevalonsäure

Bevor die Entwicklung eines neuen Tests auf die microsomale HMG-CoA-Reduktase der Rattenleber in Angriff genommen wurde, erschien es sinnvoll, einige zusätzliche Informationen zur Chemie des Produktes der von diesem Enzym katalysierten Reaktion, der Mevalonsäure, zu gewinnen. Dies umsomehr, als zu diesem Thema in der Literatur Behauptungen vorgebracht wurden, denen gegenüber die allergrößte Skepsis geboten erschien.

Siperstein et al. (64) beschrieben kürzlich ein bereits früher (51) von ihnen umrissenes Verfahren zur Isolierung und quantitativen Bestimmung radioaktiv markierter HMGS und MVS aus biologischem Material.

Im wesentlichen besteht das genannte radiogaschromatographische Verfahren (64) darin, Gewebepräparate mit radioaktivem Acetat in Gegenwart von unmarkiertem HMGA bzw. MVA zu inkubieren, anschließend alkalisch zu hydrolysieren, anzusäuern und unverseifbare Neutralsubstanzen sowie Fettsäuren durch Petrolätherextraktion zu entfernen; sodann HMGS bzw. MVS mit Äther zu extrahieren und zwecks weiterer Reinigung in die Dibenzyläthylendiammoniumsalze zu überführen. Schließlich wird die organische Base durch KOH-Zugabe freigesetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Ansäuern der wäßrigen Phase mit Salzsäure wandelt Mevalonat bzw. HMG in Verbindungen um, die sich durch Ätherextraktion isolieren lassen. Die eine ist zweifellos HMGS. Bei der anderen aber handelt es sich – entgegen der Annahme Sipersteins und seiner Mitarbeiter – nicht um MVS (Abb. 24, Formel I, $R_1 = R_2 = R_3 = H$), sondern um das daraus durch innermolekulare Veresterung gebildete MVL (Formel II, R = H). Bildungs- und Hydrolysegeschwindigkeitskonstanten des MVL sowie die Gleichgewichtslage des Systems MVL/MVS sind meines Wissens bisher in der Literatur nicht mitgeteilt worden. Und es fällt auf, daß auch die Eigenschaften der MVS noch nicht beschrieben wurden: wahrscheinlich, weil die Isolierung der MVS beträchtliche Schwierigkeiten bereitet. So wird bei der präparativen Darstellung (95-100) oder bei der Isolierung aus biochemischen Inkubationsansätzen (41,57,61,101,102) nach Ansäuern einer wäßrigen Mevalonatlösung mit Mineralsäuren stets MVL – und nicht MVS – durch Lösungsmittelextraktion gewonnen. Siperstein (64) benützt das gleiche Isolierungsverfahren.

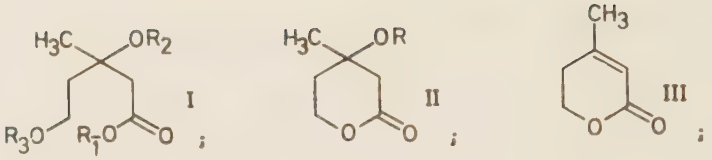


Abbildung 24

Struktur einiger Mevalonsäurederivate

Die große Tendenz der MVS zum Lactonringschluß, die sich hier kundtut, bildet keine Ausnahmeerscheinung. Sie ist vielmehr für δ- und insbesondere γ-Hydroxycarbonsäuren charakteristisch (103,104). In vielen Fällen führten Verfahren, die deren präparative Darstellung zum Ziele hatten, direkt zum entsprechenden Lacton.

1. Kinetik der Lactonbildung aus MVS

Um genaue Informationen über die Geschwindigkeit der Mevalolactonbildung aus der Säure zu gewinnen, wurde eine schwach alkalische Mevalonatlösung angesäuert. Zu verschiedenen Zeiten danach wurden Aliquote der Mischung entnommen und – um die Reaktion zu stoppen – sofort einer 2M Hydroxylaminlösung, pH 7.1, zugemischt. Die Volumen- und Konzentrationsverhältnisse wurden so gewählt, daß sich das pH der Hydroxylaminlösung dadurch praktisch nicht änderte und anschließend die entstandene Hydroxamsäure kolorimetrisch bestimmt werden konnte. Dieses Verfahren folgt weitgehend der von Lynen und Graßl (101) angegebenen Vorschrift (exptl. Einzelheiten S. 121). Hestrins Verfahren (105) hingegen war für diese Untersuchung unbrauchbar, da das pH der von ihm verwendeten Hydroxylaminlösung zu hoch (Hydrolyse des Lactons) und ihre Pufferkapazität zu gering ist.

In Abb. 25 ist der zeitliche Verlauf der MVL-Bildung aus MVS bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Im eingesetzten Diagramm sind die dekadischen Logarithmen der zum jeweiligen Zeitpunkt verbliebenen MVS-Konzentrationen [mM] über der Reaktionszeit aufgetragen. Daß die Meßpunkte dann auf Geraden liegen, weist auf Reaktionen erster Ordnung hin. Die Steigungen der Geraden geben die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen an. Diese sind ihrerseits wieder lineare Funktionen der H^+-Konzentration (Abb. 26).

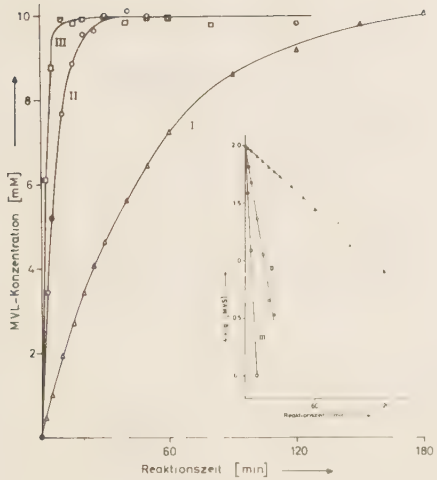


Abbildung 25

MVL-Bildung bei verschiedenen pH-Werten (25^0C)

Die MVS-Konzentration zu Beginn war bei allen 3 Versuchen gleich groß (10^{-2}M).
I: pH 1.63; II: pH 1.07; III: pH 0.72.
Einsatz: Halblogarithmische Auftragung

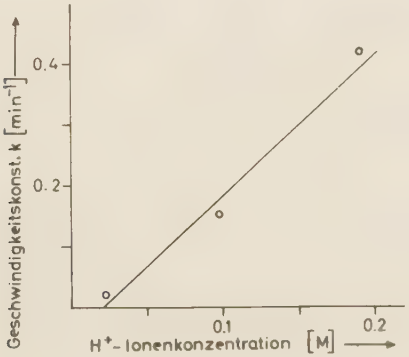


Abbildung 26

Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der MVL-Bildung von der H^+-Konzentration (25^0C).

Schließlich zeigt Abb. 27a, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Konzentration des eingesetzten Mevalonats – und damit der MVS – wächst (siehe auch Gl. 11, S.41). Halblogarithmische Auftragung wie bei Abb. 25 (eingesetztes Diagramm) ergibt nahezu parallele Geraden (Abb. 27b). D.h. die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten hängen nicht von der MVA-Konzentration ab (siehe auch Gl. 13, S. 41).

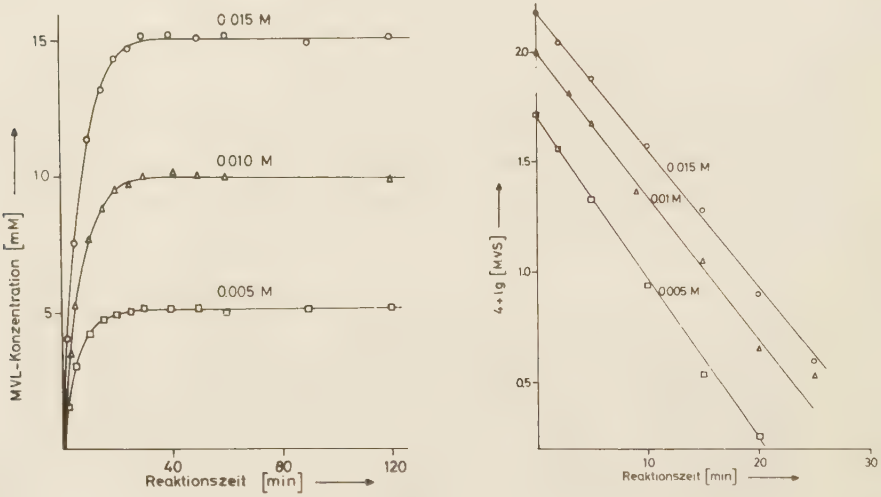


Abbildung 27a

Zeitlicher Verlauf der MVL-Bildung bei verschiedenen MVS-Ausgangskonzentrationen. pH: 1.07; 25°C.

Abbildung 27b

Derselbe Vorgang, halblogarithmische Auftragung. Kurvenparameter: MVS-Ausgangskonzentration.

Diese kinetischen Daten lassen sich folgendermaßen interpretieren: Die Cyclisierung der zu MVS konjugierten Säure $MVSH^+$ ($MVSH^+$ steht über rasch ablaufende Protonierungs-/Deprotonierungsreaktionen mit MVS im Gleichgewicht) stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Umwandlung von MVS in MVL dar. Betrachten wir die Geschwindigkeit zu Anfang des Reaktionsablaufes, so fällt die Geschwindigkeit der Rückreaktion noch nicht ins Gewicht und die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion ist gleich der der Hinreaktion:

$$v = \frac{d\,[MVL]}{dt} = -\frac{d\,[MVA]}{dt} = k_1\,[MVSH^+]\,. \qquad (9)$$

Mit

$$\frac{[MVS]\,[H^+]}{[MVSH^+]} = K \qquad (10)$$

folgt aus (9) und (10):

$$-\frac{d\,[MVA]}{dt} = \frac{k_1}{K}\,[MVS]\,[H^+] \qquad (11)$$

und, da unter den Versuchsbedingungen MVA vollständig als MVS vorliegt, gilt nach Umformung von (11), wenn außerdem

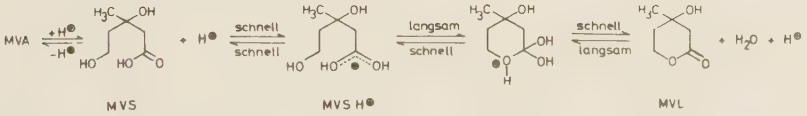
$$\frac{k_1}{K}\,[H^+] = k \qquad (12)$$

gesetzt wird:

$$-\frac{d\,\ln\,[MVA]}{dt} = k\,. \qquad (13)$$

k ist die beobachtete Geschwindigkeitskonstante. Diese hängt noch – wie oben gefunden (Abb. 26) – linear von der H^+-Konzentration ab, Gl. (12). D.h. die Steigung der Geraden in Abb. 26 stimmt bis auf den Faktor $1/K$ mit k_1, der Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion 1. Ordnung überein.

Damit ergibt sich folgendes Reaktionsschema für die Lactonisierung (Abb. 28):



Aus der Temperaturabhängigkeit der Lactonisierungsgeschwindigkeit (Abb. 29a) lassen sich die Aktivierungsparameter der MVL-Bildung gewinnen. Die bereits oben erwähnte halblogarithmische Auftragung (Abb. 29b) führt auch hier wieder zu Geraden.

Trägt man den Logarithmus von deren Steigung kt über der zugehörigen reziproken absoluten Temperatur auf, so liegen diese Punkte erneut auf einer Geraden (Abb. 30).

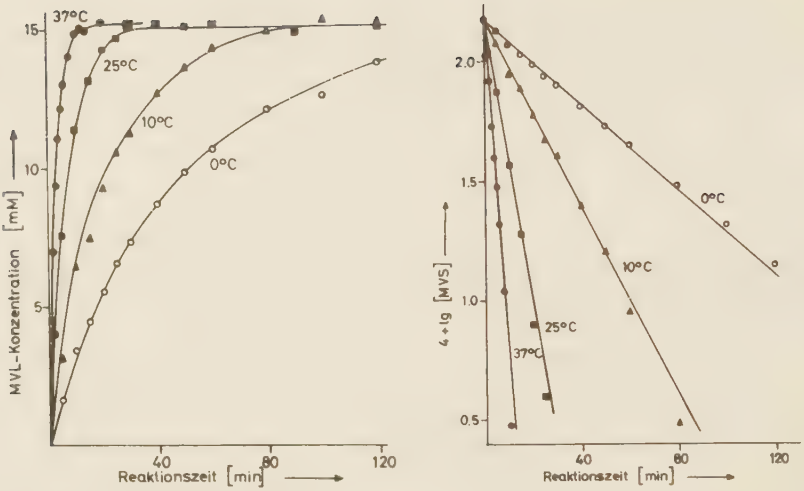


Abbildung 29a

Temperaturabhängigkeit der MVL-Bildungsgeschwindigkeit

Abbildung 29b

Halblogarithmische Auftragung

MVA-Ausgangskonzentration: 10 mM; pH 1.07

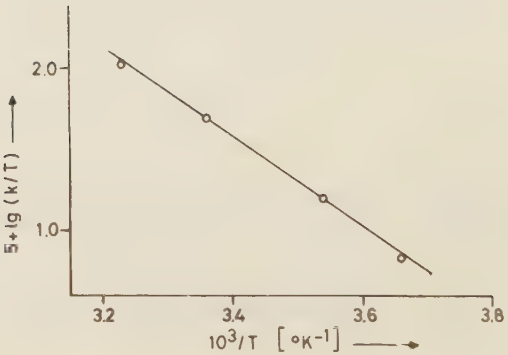


Abbildung 30 siehe Text

Mit Hilfe des Wertes für die Steigung dieser Geraden lassen sich die Aktivierungsparameter nach

$$\Delta H^{\ddagger} = -R\left[\frac{d\,(\ln k)}{d(1/T)} + T\right] \quad cal \cdot Mol^{-1}$$

und

$$\Delta S^{\ddagger} = \frac{\Delta H^{\ddagger}}{T} + R \cdot \ln\frac{k \cdot h}{k_B \cdot T} \quad cal \cdot Mol^{-1} \cdot Grad^{-1}$$

berechnen. Dabei bedeuten: $\Delta H^{\ddagger}$ = Aktivierungsenthalpie; $\Delta S^{\ddagger}$ = Aktivierungsentropie; R = Gaskonstante; k = Geschwindigkeitskonstante der MVL-Bildung (Steigung der Geraden in Abb. 29b); h = Plancksche Wirkungskonstante; k_B = Boltzmannkonstante; T = Absolute Temperatur. Es wird gefunden:

$$\Delta H^{\ddagger} = 12{,}7 \quad kcal \cdot Mol^{-1}$$
$$\Delta S^{\ddagger} = -28{,}1 \quad cal \cdot Mol^{-1} \cdot Grad^{-1}$$

Während die Aktivierungsenthalpie von einer Größe ist, wie sie normalerweise für Veresterungen gefunden wird, ist der Entropiewert wesentlich kleiner (negativer) als für normale Veresterungen üblich. Letzteres wird aber sofort erklärlich, wenn man bedenkt, daß das Eintreten der zur Cyclisierungsreaktion günstigen Konformation wenig wahrscheinlich ist.

Messungen der MVL-Bildung bei noch höherer Säurekonzentration als der höchsten bei Abb. 25, S. 39 aufgeführten waren mit der Hydroxamsäuremethode nicht möglich, weil 1) diese Reaktionen, wie Vorversuche ergeben hatten, bereits innerhalb einer Minute weitgehend abgelaufen sind und außerdem 2) die Pufferkapazität der Hydroxylaminlösung nicht mehr ausreichte, um auch nach Abstoppen der Lactonisierungsreaktion ein pH von 7.0 einzuhalten.

Damit die Entstehung des Lactons auch noch in 2.5 M HCl gemessen werden konnte, der Salzsäurekonzentration, bei der Siperstein et al. (64) MVS aus wäßriger Lösung durch dreimaliges Ausschütteln (à 5 min) extrahiert haben wollen, mußte ein anderes Verfahren eingesetzt werden.

Bei Versuchen zur Entwicklung einer gaschromatographischen Bestimmungsmethode für HMG-CoA-Reduktase (hierüber wird in Abschnitt IV, S. 57 ff. berichtet) fand ich, daß nicht nur freie Carbonsäuren – und hier sogar Verbindungen wie die o,o'-disubstituierte Benzoesäure: 2-Methyl-4,6-dihydroxybenzoesäure (Orsellinsäure) – mit

Trimethylchlorsilan und BTMSAA quantitativ in die entsprechenden Trimethylsilylester zu überführen sind, sondern auch deren Salze. So ergaben Natrium-di- und trihydroxycholanate gaschromatographisch leicht zu bestimmende Produkte in gleicher Weise wie die freien Gallensäuren. Natriummevalonat wandelte sich unter diesen Bedingungen in ein einziges leichtflüchtiges Produkt um, dessen Retentionszeit weit kürzer war, als die des MVL-Trimethylsilyläthers (MVLTMS, S. 38 , Abb. 24, Formel II, R = $-SiMe_3$), der sich hierbei aus MVL bilden würde. Auch wenn die Verbindung weder isoliert noch charakterisiert wurde, so dürfte doch kaum ein Zweifel darüber bestehen, daß es sich um Tris-(trimethylsilyl)-mevalonat (TTMSMVA) handelt (S. 38 , Abb. 24, Formel I, $R_1 = R_2 = R_3 = -SiMe_3$). Wichtig war nun, daß TTMSMVA auch quantitativ entsteht, wenn eine wäßrige Lösung des Salzes (oder der Säure) mit einem solchen Überschuß an Trimethylsilierungsagens versetzt wird, daß zuerst alles Wasser in das sehr leichtflüchtige Hexamethyldisiloxan überführt wird. Ein solches Verfahren müßte sich auch zur quantitativen gaschromatographischen Bestimmung des Gehaltes wäßriger Salzlösungen solcher Säuren verwenden lassen, die wegen ihrer Unbeständigkeit (z.B. α- und β-Ketocarbonsäuren) eine Isolierung nicht gestatten oder wegen ihrer hervorragenden Wasserlöslichkeit bzw. hygroskopischen Natur schwer zu extrahieren bzw. wasserfrei zu erhalten sind (z.B. freie und konjugierte Gallensäuren, Sulfonsäuren und deren Salze).

Zur Messung der rasch ablaufenden Lactonbildung wurde eine MVA-Lösung geeigneter Konzentration mit dem gleichen Volumen 5 N Salzsäure versetzt und ein Teil der Mischung rasch in eine Microliterspritze aufgezogen. Aus dieser wurde alle 10 sec 1 µl Lösung abgegeben und sofort in ein Trimethylsilierungsagens eingetragen. Aliquote der solcherart erhaltenen Lösung von trimethylsilierten Derivaten der MVS wurden gaschromatographisch analysiert. Der Ablauf der Reaktion war gleichzeitig an der Änderung der Konzentration von MVS und MVL zu verfolgen. Vor der Reaktion liegt alle MVS in Form des Salzes vor. Trimethylsilierung von MVA bzw. MVS ergibt TTMSMVA. Mit zunehmender Reaktionszeit aber wandelt sich immer mehr MVS in MVL um, dessen Trimethylsilierung zu MVLTMS führt. Abb. 31 zeigt ein solches Gaschromatogramm. Um die Belegung der Elektroden mit SiO_2 zu verhindern, wurde die H_2-Flamme des Flammenionisationsdetektors am Ende der Lösungsmittelfront (siehe dazu S. 66 Mitte), kurz vor Erscheinen des TTMSMVA-Gipfels, gezündet. SiO_2 entsteht bei der Verbrennung des TMS-Agens im Detektor und verändert dessen Empfindlichkeit

stark, wenn es sich auf den Elektroden niederschlägt. Als innerer Standard zur quantitativen Auswertung (siehe Exptl. Teil S. 123) wurde Tridecansäuremethylester (TDSME) verwendet.

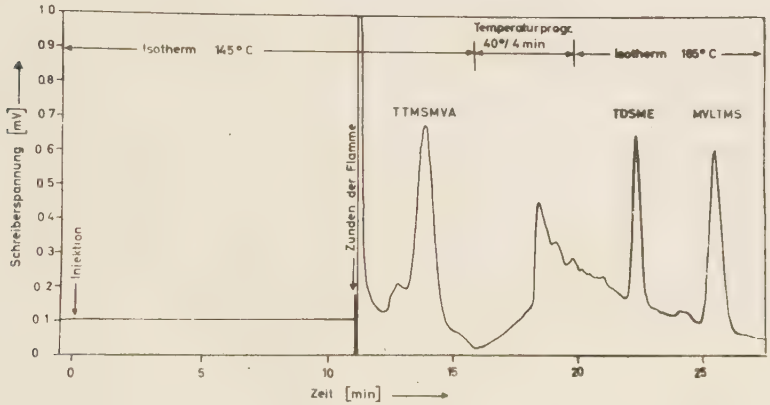


Abbildung 31

Gaschromatographische Analyse von TTMSMVA und MVLTMS
Exptl. Einzelheiten S. 122

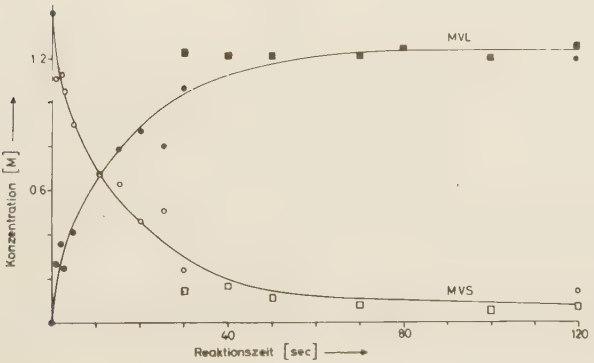


Abbildung 32

Zeitlicher Verlauf der MVL-Bildung aus MVS

□■ 1. Versuch ○● 2. Versuch

MVS-Konzentration in der Reaktionsmischung bei t = 0: 1,6 M; Temperatur: 20°C

Aufeinanderfolgende Gaschromatographie der nach zunehmender Reaktionszeit erhaltenen trimethylsilierten Proben sollte eine Abnahme des TTMSMVA-Gipfels bei gleichzeitiger Zunahme des MVLTMS-Gipfels ergeben. Die so gewonnenen quadratischen Meßpunkte in Abb. 32 bestätigen dies. Der erste Meßpunkt nach dem Start der Reaktion konnte mit dieser Versuchsanordnung erst nach 30 sec erhalten werden, zu welcher Zeit die Reaktion nahezu beendet war. In einer zweiten Versuchsreihe wurden je 1 µl MVA-Lösung und 5 N Salzsäure an der Wandung eines Reagensglases vermischt. Die Umsetzung konnte durch Trimethylsilierungsagens, das sich auf dem Boden des Glases befand, auch nach bereits 1 sec gestoppt werden. Die runden Meßpunkte markieren den Verlauf der Reaktion. Die nun schon mehrfach verwendete halblogarithmische Auftragung der Konzentration über der Zeit gibt zu erkennen, daß die Lagen der Meßpunkte gut durch Geraden anzunähern sind (Abb. 33a und b).

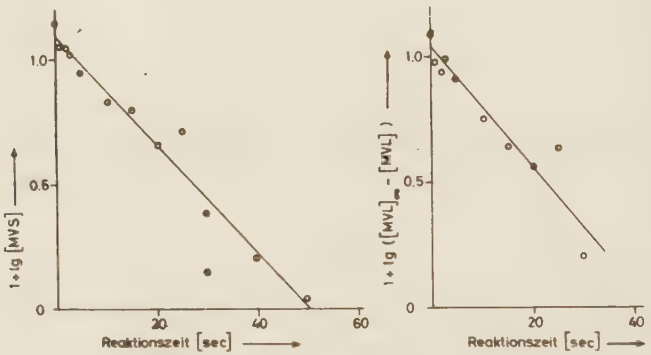


Abbildung 33

Halblogarithmische Auftragung der Konzentration von MVS und MVL über der Reaktionszeit.

a) MVS-Abnahme b) MVL-Bildung

$[MVL]_\infty$ ist die Konzentration von MVL nach vollständigem Ablauf der Reaktion; [MVL] ist die MVL-Konzentration zum Zeitpunkt t.

Daraus lassen sich Halbwertszeiten für die Abnahme der MVS- bzw. Zunahme der MVL-Konzentration ermitteln. Sie betragen 14 bzw. 12 sec. (Exptl. Einzelheiten zu diesen Versuchen S. 122).

Es ist also klar, daß Siperstein (s.o.; (64)) aus stark salzsaurer Lösung nicht MVS – wie er meint – sondern MVL extrahierte.

2. Lage des Gleichgewichtes MVL/MVS

Daß MVA, MVS und MVL miteinander im Gleichgewicht stehen, veranschaulicht Abb. 28, S. 41. Es leuchtet ein, daß der im Gleichgewicht vorliegende Anteil des MVL vom pH-Wert der Lösung abhängen muß. Um diesen Anteil kennenzulernen, wurden gleiche Volumina einer Mevalonatlösung auf verschiedene pH-Werte angesäuert (gleiche Endvolumina). Nach 19-, 237- und 355-stündigem Stehen wurde das inzwischen entstandene MVL mit der Hyroxamsäuremethode bestimmt (Abb. 34).

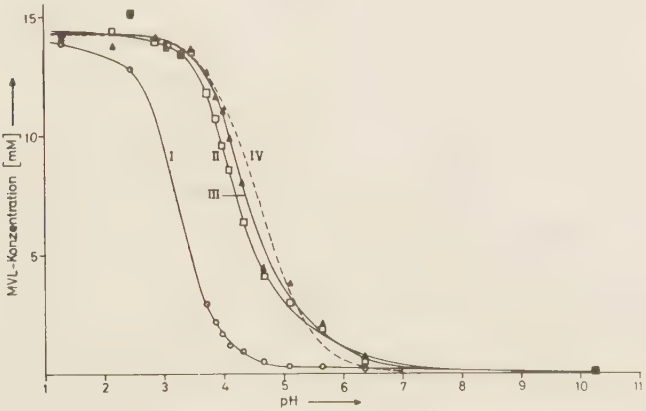


Abbildung 34

Zur Lage des pH-abhängigen Gleichgewichtes MVS/MVL (22°C)

Messung nach 19 h (I), 237 h (II), 355 h (III). Kurve IV wurde berechnet. Nähere Einzelheiten im Text und im Exptl. Teil, S. 122.

Aus den bereits relativ kleinen Änderungen der MVL-Konzentrationen von 237 auf 355 h ist ersichtlich, daß die Gleichgewichtszustände bei 355 h Reaktionsdauer nahezu erreicht sind.

Die Gleichgewichtskonstante für das System MVL/MVS in verdünnter wäßriger Lösung lautet:

$$[MVL]/[MVS] = K_E \qquad (14)$$

und die für die Dissoziation von MVS:

$$[MVA]\,[H^+]\,/[MVS] = K_D \qquad (15)$$

Ferner ist die Gesamtkonzentration an Mevalonsäurederivaten:

$$c = [MVA] + [MVL] \tag{16}$$

Da beide Gleichgewichtssysteme in derselben Lösung vorliegen, muß [MVS] in Gl. (14) und (15) gleich groß sein. Aus diesen 3 Gleichungen ergibt sich dann für die Gleichgewichtskonzentration des Lactons:

$$[MVL] = \frac{K_E \cdot c \cdot [H^+]}{K_D + K_E \cdot [H^+]} \tag{17}$$

Aus Gl. (17) folgt, daß $$[MVL] = \frac{c}{2} \tag{18}$$

wenn $$K_E \cdot [H^+] = K_D \tag{19a}$$

oder logarithmiert nach Einführung von pH- und pK-Wert:

$$\lg K_E = p_H - p_K \tag{19b}$$

Kennt man p_K, so kann die Gleichgewichtskonstante für das MVS/MVL-System berechnet werden, wenn man außerdem aus einer Gleichgewichtskurve analog Kurve III, Abb. 34, den p_H-Wert entnimmt, bei welchem Gl. (18) erfüllt ist. Wolf et al. (96) ermittelten für MVS einen p_K-Wert von 4,3. Angenommen Kurve III sei eine derartige Gleichgewichtskurve: dann findet man für den fraglichen pH-Wert 4.4 und errechnet für K_E nach Gl. (19b) ungefähr 1. Der Wert müßte eher höher liegen, da das Gleichgewicht noch nicht vollständig erreicht war, als Kurve III(Abb. 34) aufgenommen wurde. Berechnet man nach Gl. (17) den MVL-Gehalt in Abhängigkeit vom pH-Wert, wobei $K_E = 2$ gesetzt wird, so ergibt sich die gestrichelte Kurve IV in Abb. 34, die der experimentell erhaltenen Kurve III einigermaßen nahekommt.

3. Wassereliminierung aus MVL

In der Literatur wird Mevalonsäure zuweilen synonym für Mevalonat oder Mevalolacton benützt, was insofern gerechtfertigt ist, als in wäßriger Lösung alle drei Substanzen miteinander im pH-abhängigen Gleichgewicht stehen. Aus den angegebenen Werten geht dann aber hervor, welche Substanz in erster Linie vorliegt. Daß Siperstein et al. (64) jedoch die Säure selbst – und nicht das Lacton – meinen, erhellt daraus, daß sie die aus angesäuerter MVA-Lösung extrahierte "MVS" anschließend in wasserfreiem Methanol mit Diazomethan behandeln und das Reaktionsprodukt als MVS-Methylester

(S. 38, Abb. 24, Formel I, $R_1 = CH_3$, $R_2 = R_3 = H$) bezeichnen. Wenn es auch Schwierigkeiten bereitet, einen Mechanismus auszudenken, nach dem CH_2N_2 unter den genannten Bedingungen MVL in Methylmevalonat umwandeln könnte, so fehlt es in der Literatur doch nicht an Berichten über die Darstellung von Methylestern aus Lactonen.

Substanzen vom Typ der Allylessigsäure stehen im Gleichgewicht mit den entsprechenden isomeren γ-Valerolactonen (106,107). Man kann die Säure durch Veresterung mittels Diazomethan abfangen und das Lacton quantitativ in den offenkettigen Ester überführen. Diese Reaktion ließen Billeter und Miescher (108) in ätherischer Lösung ablaufen, um ein Derivat eines komplizierten Naturstoffes zu erhalten. Als Produkt einer solchen Reaktion müßte aus MVL 3-Hydroxy-3-methyl-penten-(4)-säuremethylester entstehen, nicht aber MVS-Methylester. In einem anderen Fall inkubierten Spencer und Wright (109) in wasserfreiem Methanol γ-Valerolacton mit CH_2N_2 ($+1^0$C, 8 Tage lang) und isolierten 4-Hydroxyvaleriansäuremethylester. Die Autoren erwähnen jedoch nicht, ob diese Substanz auch in Abwesenheit von CH_2N_2 entsteht; möglicherweise handelt es sich um eine Solvolysereaktion ohne Beteiligung von Diazomethan.

Es wurde nun untersucht, ob sich MVL in absolutem Methanol mit CH_2N_2 umsetzt. Gaschromatographische Analyse des Reaktionsansatzes ergab auch nach 20tägiger Inkubation außer dem symmetrischen MVL-Gipfel keine weiteren starken Gipfel. MVL reagiert also nicht mit Diazomethan und Siperstein und Mitarbeiter (64) können somit unter diesen Bedingungen kein Methylmevalonat erhalten haben.

Ihren "MVS-Methylester" charakterisierten diese Autoren (64) durch Umsetzung in einer äthanolischen Lösung von Borfluorid. Das Reaktionsprodukt, welches sich aufgrund seines gaschromatographischen Verhaltens vom Ausgangsmaterial unterscheidet, sprechen sie, in der Annahme, eine Umesterung vorgenommen zu haben, als MVS-Äthylester an (S. 38, Abb. 24, Formel I, $R_1 = C_2H_5$, $R_2 = R_3 = H$). Sie begründen ihre Meinung damit, daß es gleiche Retentionszeit besitze wie Standardäthylmevalonat. Wie sie letzteres bereiten und charakterisieren, geben sie nicht an. Für "Methylmevalonat" finden sie bei 175^0 Säulentemperatur eine Retentionszeit von 16,8 min, für das höhere Homologe Äthylmevalonat aber bei einer um 30^0 niedrigeren Temperatur (unter sonst gleichen Bedingungen) eine Retentionszeit von nur 10,5 min. Ersetzen wir jetzt – wie bereits begründet – "Methylmevalonat" durch MVL: dann bleibt immer noch die erstaunliche Tatsache, daß MVL sich in seinem gaschromatographischen Verhalten so

drastisch von Äthylmevalonat unterscheiden soll. Beide Substanzen besitzen als polare Reste eine tertiäre OH-Gruppe und eine Esterfunktion. Das Molekulargewicht des Äthylesters ist aber um 35% höher als das des Lactons. Trotzdem sollte das ringförmige Lacton auf der Polyestersäule so auffallend viel stärker zurückgehalten werden als der offenkettige Ester!

Dieses Paradoxon löste sich auf im Lichte von Beobachtungen, die Kirschner (110) gemacht hatte. Seinem Versuch, aus Na-MVA mit Dimethylsulfat MVS-Methylester herzustellen, blieb der Erfolg versagt. Eine Reihe weiterer Versuche, den Ester zu erhalten, demonstrierten nur dessen Instabilität und die große Tendenz zur Ausbildung des Lactonrings. Ferner fand er, daß in Gegenwart des sauren Katalysators HCl MVL eine Molekel Wasser eliminiert und in das α,β-ungesättigte Lactenon 3-Methylpenten-(2)-olid-(1.5) (S. 38 , Abb. 24, Formel III) übergeht.

Diese Versuche wurden wiederholt (111), indem MVL in Methanol mit verschiedenen Katalysatoren inkubiert wurde: HCl, H_2SO_4, p-Toluolsulfonsäure, BF_3. Die gaschromatographische Analyse der Reaktionsprodukte ergab, daß in allen Fällen dasselbe Hauptprodukt entstanden war. D.h. der Befund Kirschners über die Wasserabspaltung durch saure Katalysatoren war auch auf den Fall der BF_3-Katalyse auszudehnen. Damit war aber auch Sipersteins Äthylmevalonat wahrscheinlich in 3-Methylpenten-(2)-olid-(1.5) umzubenennen.

Um dies vollends zu entscheiden, wurde MVL mit BF_3 a) in Methanol, b) in Äthanol als Lösungsmittel erhitzt. (Exptl. Einzelheiten S. 124). Nach Sipersteins Vorstellung (64) müßten dabei zwei verschiedene Reaktionsprodukte entstehen, nämlich Methyl- bzw. Äthylmevalonat. Würde aber eine β-Eliminierung von Wasser stattfinden, so müßten beide Ansätze das gleiche Reaktionsprodukt liefern.

Die gaschromatographische Analyse machte wahrscheinlich, daß identische Produkte entstanden waren. Ihre Retentionszeiten betrugen 5,46 min (Reaktion in Methanol) bzw. 5,48 min (Reaktion in Äthanol). Die Reaktionsprodukte wurden durch Vakuumdestillation gereinigt. Ihre chemische Analyse ist eine weitere starke Stütze für ihre Identität und stimmt mit den Werten für das Dehydratisierungsprodukt $C_6H_8O_2$ und nicht mit denen für MVL-Äthylester $C_8H_{16}O_4$ überein (Tab. 2):

	MVL + BF_3 + Methanol	MVL + BF_3 + Äthanol	Berechnet für $C_6H_8O_2$	$C_8H_{16}O_4$
% C	64,02	63,99	64,27	54,53
% H	7,42	7,40	7,19	9,13

Die UV-Spektren der beiden Präparate in Cyclohexan zeigen je ein Bandenmaximum bei 209 mμ und ε-Werten von 11600 cm^2/mMol (MVL + BF_3 + Methanol) bzw. 10400 cm^2/mMol (MVL + BF_3 + Äthanol). Diese Werte stimmen befriedigend mit in der Literatur für 3-Methylpenten-(2)-olid-(1.5) angegebenen (99,112) überein. Ferner besitzen beide Präparate identische IR-Spektren (Abb. 35) und NMR-Spekten (Abb. 36).

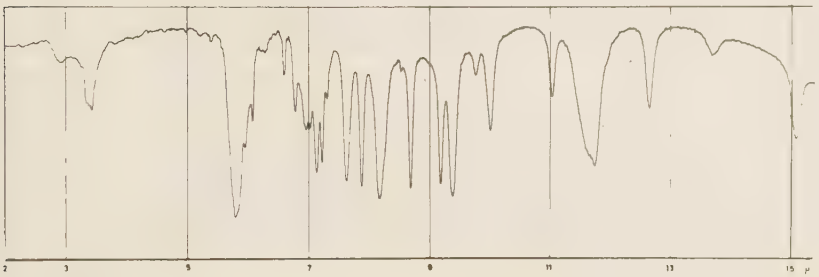


Abbildung 35

IR-Spektrum von 3-Methylpenten-(2)-olid-(1.5).

Aufgenommen mit dem Gerät Perkin-Elmer Modell 21, NaCl-Prisma. Lactenon als Film zwischen NaCl-Platten.

Das NMR-Spektrum (Abb. 36) enthält vier Gruppen von Signalen (A-D). Das erste (A) (τ = 4,38 ppm) rührt von einem einzelnen Proton her, dessen Signal durch weittragende Kopplung mit drei Methyl- und zwei Methylenprotonen sowohl in ein Quadruplett als auch in ein Triplett aufgespalten wird. Da die Kopplungskonstanten beider Kopplungen identisch sind (J = 1,4 Hz), entsteht durch Überlagerung ein Signal aus sechs Gipfeln, deren Flächen sich wie 1 : 5 : 10 : 10 : 5 : 1 verhalten müssen. Dieses bei Verwendung eines Sweep-Bereiches von 50 Hz erkennbare Signal (A') ist in Abb. 36 über dem bei 500 Hz Sweep-Bereich erhalten (A) dargestellt. Das Signal der genannten Methylgruppe (D) (τ = 8,01 ppm) besteht, wie bei einem Sweep-Bereich von 50 Hz deutlich wird, aus fünf Gipfeln (D') (in Abb. 36 zwischen CH_3- und TMS-Signal eingeschoben).

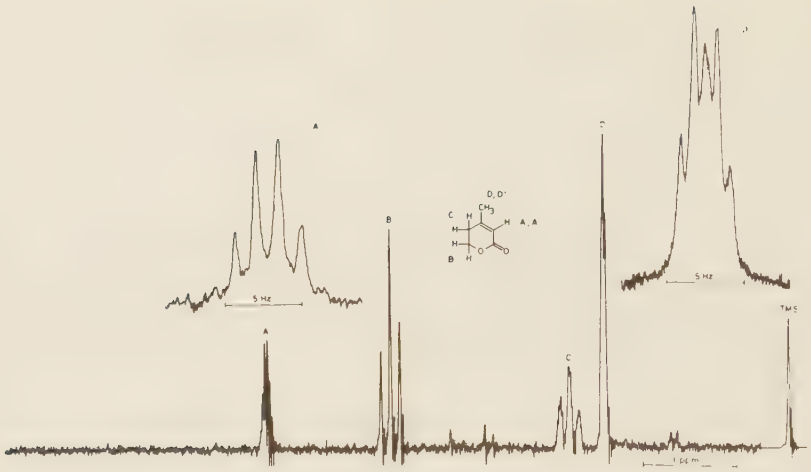


Abbildung 36

NMR-Spektrum von 3-Methylpenten-(2)-olid-(1.5)

Aufgenommen mit dem Gerät A60 der Firma Varian. Lösungsmittel: CCl_4; TMS als innerer Standard; Sweep-Bereich 500 Hz. Die Multipletts A' und D' wurden bei einem Sweep-Bereich von 50 Hz aufgenommen.

Diese kommen zustande, wenn ein Dublett (hier: J = 1,4 Hz; weittragende Kopplung mit dem bereits erwähnten einzelnen Proton) wieder in ein Triplett (hier: J = 0,8 Hz) aufgespalten wird und sich die beiden innersten Gipfel überlagern. Die Triplett-Aufspaltung des Methyl-Dubletts wird ebenfalls durch weittragende Kopplung mit zwei Methylenprotonen bewirkt. Das Signal dieser Methylenprotonen (C) erscheint als Triplett (τ = 7,65 ppm; J = 6 Hz). Jeder Gipfel des Tripletts müßte eigentlich wieder in ein Quadruplett (weittragende Kopplung mit den Methylprotonen) der Kopplungskonstante J = 0,8 Hz und in ein Dublett (durch weittragende Kopplung mit dem einzelnen Proton) der Kopplungskonstante J = 1,4 Hz aufgespalten sein. Mit einem Sweep-Bereich von 50 Hz trat diese Feinstruktur aber wegen der Verschiedenheit der beiden weittragenden Kopplungen nicht mehr klar zutage; weshalb darauf verzichtet wurde, diesen Zusatz in Abb. 36 einzublenden. Daß das Signal der genannten Methylenprotonen (C) als Triplett (J = 6 Hz) erscheint, hat seine Ursache in der Nachbarschaft einer weiteren Methylengruppe. Deren Signal (B) bei τ = 5,73 ppm wird nämlich mit derselben Kopplungskonstante wie das der benachbarten Methylenprotonen (J = 6 Hz) in eine Triplett aufgespalten.

Diese Ergebnisse befinden sich im Einklang mit denen Keller-Schierleins (112,113), der das Lactenon (Formel III, S. 38) bereits früher durch Oxydation von Ferrirubin erhalten und die Verbindung aufgrund ihres NMR-Spektrums als 3-Methylpenten-(2)-olid-(1.5) erkannt hatte.

Die Art und die Lage der Multipletts sowie die Größen der Kopplungskonstanten bewiesen die Struktur der Verbindung, die bei Einwirkung von BF_3 auf MVL in Methanol oder Äthanol entsteht, als 3-Methylpenten-(2)-olid-(1.5).

Es mußte nun noch ausgeschlossen werden, daß bei der BF_3-katalysierten Dehydratisierung nicht zunächst in einer schnellen Reaktion der jeweilige offenkettige Ester gebildet wird, der dann in langsamen Folgereaktionen auf irgend eine Weise zum Lactenon weiterreagiert. Verfolgung der Reaktion mittels Gaschromatographie ergab (Exptl. Einzelheiten S. 124), daß im selben Maße, wie der MVL-Gipfel kleiner wurde, der Gipfel des Dehydratisierungsproduktes wuchs (Abb. 37). Aber eine weitere Substanz, die durch zeitliche Konzentrationsänderungen ihre Beteiligung am Reaktionsgeschehen kundgetan hätte, konnte zu keiner Zeit im Gaschromatogramm beobachtet werden. D.h. das Lactenon wird direkt ohne Zwischenschaltung von Äthylmevalonat aus MVL gebildet und Sipersteins Umesterungsreaktion ist also in Wahrheit eine Wassereliminierung.

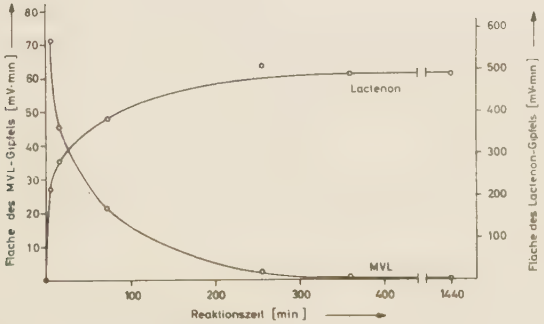


Abbildung 37

Kinetik der Abnahme von MVL und der Entstehung des Lactenons

Damit ist gezeigt, daß erstens: Siperstein und Mitarbeiter bei ihrem Verfahren zur quantitativen Mevalonatbestimmung (51,64) nicht Methylmevalonat als flüchtiges Derivat der MVS zur Gaschromatographie einsetzten, sondern MVL und zweitens: der angebotene Beweis für das Vorliegen von Methylmevalonat falsch ist.

Die neulich von Guchhait und Porter (114) und Hinse und Lupien (115) veröffentlichten Verfahren zur gaschromatographischen Bestimmung von MVS als MVL unterscheiden sich somit nur in Nuancen von der Sipersteinschen Methode (64).

Ferner kann in diesem Zusammenhang die Arbei von Dalgliesh, Horning et al. (116) nicht unerwähnt bleiben. Die Autoren bestimmen über 100 Komponenten des Harns gaschromatographisch. Sie säuern den Harn auf pH 1 an und extrahieren dann mehrmals mit Essigester und Äther. Die von Lösungsmitteln befreiten Extrakte werden mit CH_2N_2 verestert, anschließend trimethylsiliert und gaschromatographisch aufgetrennt. Dabei wollen die Autoren den TMS-Äther des Methylmevalonats gefunden haben. Oder sie trimethylsilieren die Extrakte ohne vorherige Diazomethan-Einwirkung und geben an, TTMSMVA erhalten zu haben. Und schließlich weisen sie auch noch MVL als MVLTMS im Gaschromatogramm nach. Dabei sollen sich alle drei MVS-Derivate bei der Gaschromatographie sehr unterschiedlich verhalten, wie den beigefügten Zahlenwerten zu entnehmen ist. Die Autoren geben nicht an, wie sie diese Gipfel identifizierten und wie sie das Referenzmaterial bereiteten. Aufgrund der genannten Bedingungen bei der Aufarbeitung und der an dieser Stelle ausgebreiteten Befunde zur Chemie der Mevalonsäure ist es ausgeschlossen, daß die Autoren die beiden erstgenannten Substanzen erhielten: Methylmevalonat-Trimethylsilyläther und TTMSMVA; sie können nur MVLTMS – die drittgenannte Verbindung – hergestellt haben. Die beiden anderen Gipfel sind anders zuzuordnen. Der Bericht von Suzue et al. (117), daß MVS und MVL auf Anionenaustauscherpapier bei pH 3.0 getrennt werden können, ist allerdings nicht zu bezweifeln.

4. Mevalolactontrimethylsilyläther

Die Umsetzung von MVL mit TMS-Agenzien läßt den Trimethylsilyläther des Lactons MVLTMS entstehen. Da diese Verbindung eine zentrale Rolle bei der Entwicklung einer neuen Methode zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität spielt, wurde sie präparativ dargestellt (Exptl. Einzelheiten S. 124). Die Elementaranalyse erbrachte befriedigende Übereinstimmung mit den für MVLTMS berechneten Werten (% C:

gefunden 53,55, berechnet 53,44; % H: gefunden 8,95, berechnet 8,97). Ein Identitätsbeweis ergibt sich aus dem Vergleich der NMR-Spektren von MVL (Abb. 38) und seinem Trimethylsilierungsprodukt (Abb. 39). In der Tabelle werden die τ-Werte (in ppm) für die Signale dieser Substanzen aufgeführt (Tab. 3):

Signal (Abb. 38,39,40)	A	B	C	D	E	F	G	H
MVL (Abb. 38)	5,45	5,58	6,28	7,41	7,44	8,07	8,63	-
MVLTMS (Abb. 39)	5,55	5,65	-	7,44	7,46	8,12	8,59	9,86
MVL-D (Abb. 40)	5,46	5,59	-	7,41	7,44	8,08	8,63	-

Wie erwartet, fehlt im Spektrum für MVLTMS (Abb. 39) das breite, einem Proton entsprechende Signal C (Abb. 38). Dafür taucht ein neues, von 9 gleichwertigen Protonen hervorgerufenes in der Nähe des TMS-Signals auf. Es besteht kein Zweifel daran, daß diese starke Signal von den Protonen der O-Trimethylsilylgruppe herrührt und jenes wenig scharfe vom Proton der tertiären Hydroxylgruppe. Wird nämlich das leicht bewegliche Hydroxylproton gegen Deuterium ausgetauscht (D_2O-Zusatz) so verschwindet das genannte Siganal bei $\tau = 6,28$ ppm abermals (Abb. 40). Daß der D_2O-Zusatz die Lage der MVL-Signale im übrigen nicht verändert, demonstriert der Vergleich der letzten Zeile der Tabelle (MVL-D) mit der für MVL.

Das MVL-Spektrum (Abb. 38) stimmt mit einem in der Literatur wiedergegebenen (118) überein.

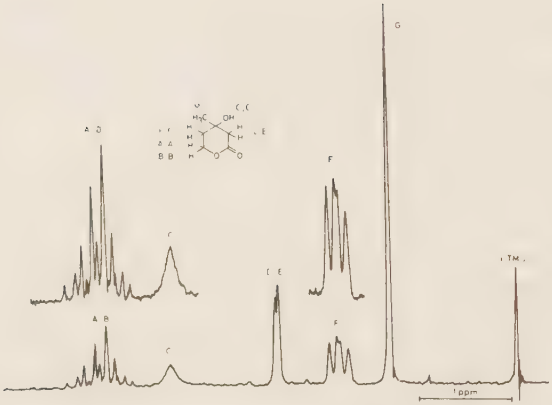


Abbildung 38

NMR-Spektrum von MVL in $CDCl_3$

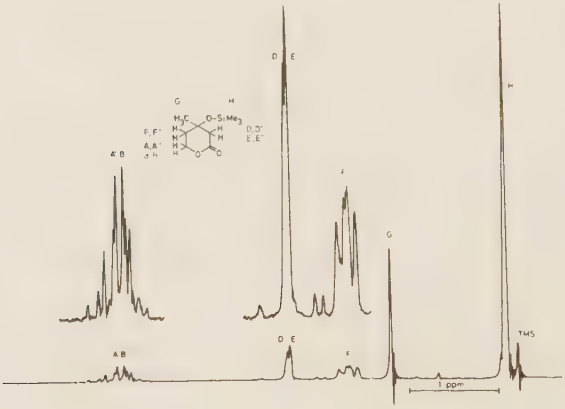


Abbildung 39

NMR-Spektrum von MVLTMS in $CDCl_3$

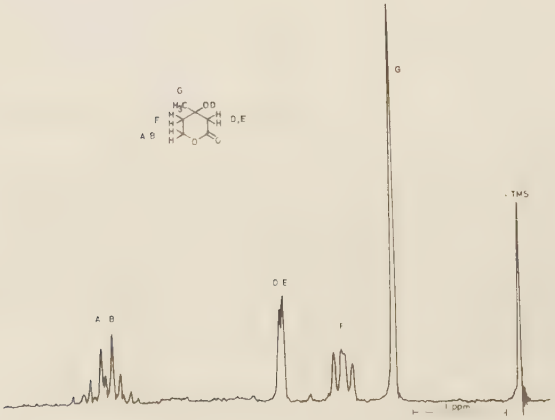


Abbildung 40

NMR-Spektrum von MVL in $CDCl_3$ nach D_2O-Zusatz

Aufgenommen mit dem Gerät A60, Firma Varian. Innerer Standard TMS. Sweep-Bereich 500 Hz.

IV. Verfahren zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität

Während die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase aus Hefe ohne vorherige weitgehende Reinigung mit Hilfe eines optischen Tests leicht ermittelt werden kann (57), bereitet die Bestimmung des entsprechenden Leberenzyms Schwierigkeiten. Die Gründe dafür wurden bereits auf S. 7 erwähnt. Das Hefeenzym ist in der löslichen Fraktion eines Autolysates dieser Zellen enthalten (57), das Leberenzym aber Bestandteil der Microsomenfraktion eines Homogenates (41).

Von verschiedenen Arbeitskreisen wurden deshalb Bestimmungsverfahren unter Verwendung von radioaktiv markiertem HMG-CoA entwickelt (siehe S. 7), die sich darin unterscheiden, auf welche Weise nach Inkubation der Lebermicrosomen mit ^{14}C-HMG-CoA und TPNH ^{14}C-HMG und ^{14}C-MVA quantitiativ getrennt werden. Verfahren, die diese Trennung schließlich durch Ätherperforation (41,57) oder Säulenchromatographie (61) erreichen, sind recht zeitraubend. Ich arbeitete deshalb eine radiogaschromatographische Methode aus, mit der sämtliche noch zu besprechenden Untersuchungen über die HMG-CoA-Reduktase an Leber durchgeführt wurden.

In der Zwischenzeit sind weitere gaschromatographische Verfahren zum genannten Zweck veröffentlicht worden. Jedoch erfordert das schon mehrfach zitierte und auf S. 37 umrissene Verfahren aus dem Sipersteinschen Laboratorium (64) sehr umfangreiche Aufarbeitung des Reaktionsansatzes, bevor ^{14}C-HMGDME und ^{14}C-MVL mittels Gaschromatographie getrennt werden können. Guchhait und Porter (114) benötigen für eine ganz ähnliche Methode gleichfalls eine große Zahl von Einzeloperationen bis ^{14}C-MVL zur Gaschromatographie gelangt und die Retentionszeit des MVL beträgt hier fast 40 min. Während diese Methoden mit Träger-MVA arbeiten und die Aktivität der Reduktase aus der spezifischen Radioaktivität des ^{14}C-MVL errechnen, bestimmen Hinse und Lupien (115) lediglich die Masse von nichtradioaktivem HMGDME und MVL. Sie geben allerdings kein Verfahren an, das es gestattet, HMG und MVL aus Inkubationsansätzen in reproduzierbarer Weise zu extrahieren. Es muß bezweifelt werden, daß diese Methode zur Bestimmung des Umsatzes an der HMG-CoA-Reduktase geeignet ist. Ein weiteres Verfahren, das ^{14}C-HMG-CoA und Träger-MVA benützt, beschrieb neulich Linn (119). Er trennt HMG und MVL mittels Dünnschichtchromatographie, bestimmt dann die Menge des MVL (mit der Hydroxamsäuremethode) und dessen Radioaktivität, um dann die Enzymaktivität zu berechnen.

1. Allgemeine Beschreibung des Verfahrens

^{14}C-HMG-CoA hoher spezifischer Radioaktivität wird in Gegenwart von TPNH oder eines TPNH-regenerierenden Systems mit Microsomen inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wird eine bekannte Menge Mevalonat als Träger zugesetzt und die Reaktion durch Erhitzen gestoppt. Die Mischung wird sodann im Vakuum zur Trockne eingedampft und MVL nach dem Verfahren von Lynen und Graßl (101) extrahiert. Dazu wird mit Schwefelsäure angesäuert, zur Bindung des Wassers mit Natriumsulfat verrührt und über Nacht stehen gelassen. Die pulvrige Masse wird viermal mit Äther eluiert, die Eluate vereinigt und der Äther abgedampft. Der Rückstand – im wesentlichen MVL – wird mit einem Trimethylsilierungsagens versetzt, das TDSME als inneren Standard enthält. MVL wird dadurch in den Trimethylsilyläther (MVLTMS; siehe S. 54) überführt. Ein Aliquot der Lösung wird in den Gaschromatographen injiziert und an einer NPGS-Säule aufgetrennt. Die im Wärmeleitfähigkeitsdetektor erzeugten Signale werden mittels Schreiber registriert. Hat die Substanz den Massendetektor verlassen, wird sie in den Verbrennungsofen geleitet, wo sie an CuO verbrannt wird, wie bereits von Karmen et al. (120) beschrieben wurde. Das entstandene Wasser wird selektiv absorbiert und $^{14}CO_2$ und Trägergas werden durch eine Durchfluß-Szintillationszelle geleitet. Die radioaktiven Zerfallsereignisse erzeugen im Szintillationsdetektor Signale, die in einem Szintillationsspektrometer gefiltert und von einem "Ratemeter" in der Impulsfrequenz analoge Spannungswerte umgeformt werden. Diese werden dann von einem Schreiber registriert. Man erhält so parallel zum Massendiagramm ein Radioaktivitätsdiagramm. Außerdem erlaubt eine digitale Impulsanzeige integrale Impulsmessung, gestattet also z.B. die einem Radioaktivitätsgipfel entsprechende Impulszahl festzustellen. Aus einer größeren Zahl von Meßwerten läßt sich dann die spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase berechnen.

2. Radioaktivität der [5-^{14}C]-HMG-CoA-Lösung

Die Empfindlichkeit des Verfahrens mußte umso größer sein, je höher die Radioaktivität des bei der Inkubation aus ^{14}C-HMG-CoA gebildeten MVA war – bei konstanter spezifischer Aktivität und Konzentration des Enzyms. Da die Radioaktivität

$$R = s \cdot m \text{ (Dimension: Zeit}^{-1}\text{)} \qquad (20)$$

ist, also das Produkt aus spezifischer Radioaktivität (Dimension: Zeit^{-1}·Masse^{-1}) und Menge der radioaktiven Substanz (Dimension: Masse), gibt es zwei Möglichkeiten das zu erreichen. Die eine ist, die Zahl der gebildeten radioaktiven Molekeln zu erhöhen; was durch Vergrößerung der Inkubationsansätze gelingt, wenn man alle Konzentrationen unverändert läßt. Das Verfahren hat den Nachteil, daß damit auch der Verbrauch an kostbarem ^{14}C-HMG-CoA steigt. Als Alternative bietet sich nach obiger Gleichung an, die Zahl der entstehenden radioaktiven Mevalonatmolekeln konstant zu halten, die spezifische Radioaktivität aber zu erhöhen. Ich wählte diese zweite Möglichkeit, zumal sie gestattet, bei Bedarf höherer Empfindlichkeit zusätzlich von der ersten Gebrauch zu machen.

[5-^{14}C]-HMG-CoA wurde enzymatisch aus β-Methylcrotonyl-CoA und $H^{14}CO_3^-$ mittels β-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (E.C.6.4.1.4) (121) und β-Methylglutaconyl-CoA-Hydratase (E.C.4.2.1.18) (122) in ähnlicher Weise bereitet, wie bereits früher (61) beschrieben. Nur mußte jetzt Isotopenverdünnung durch unmarkiertes Bicarbonat vermieden werden, um eine möglichst hohe spezifische Radioaktivität des Reaktionsproduktes zu gewährleisten.

Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität s der Lösung des gebildeten ^{14}C-HMG-CoA wird zunächst die Radioaktivität R der Lösung ermittelt Gl.(20). Da nach Entfernen allen radioaktiven Kohlendioxids nur noch [5-^{14}C]-HMG-CoA und [5-^{14}C]-Methylglutaconyl-CoA gleicher spezifischer Radioaktivität vorliegen, braucht man lediglich deren Verhältnis zu kennen, um die Radioaktivität zu errechnen, die von ^{14}C-HMG-CoA herrührt. Dazu werden die CoA-Ester verseift, HMG und MGS isoliert, in die Methylester überführt und deren Radioaktivitätsverhältnis radiogaschromatographisch bestimmt. Vor der Radiogaschromatographie werden noch in gewissen Grenzen willkürliche Trägermengen der Methylester zugesetzt. Es wurden somit (nahezu) gleichzeitig Massen- und Radioaktivitätsdiagramm erhalten (Abb. 41a und b, S. 61).

Aus den Arbeiten von Lynen et al. (123) weiß man, daß bei der alkalischen Hydrolyse von trans-β-Methylglutaconyl-CoA (diese Verbindung entsteht bei der enzymatischen Carboxylierung von β-Methylcrotonyl-CoA) ein Gemisch von cis- und trans-β-Methylglutaconat gebildet wird. Der Anteil, den cis- und trans-MGSDME zusammen an der Gesamtradioaktivität der 3 Methylester besitzen, wurde berechnet aus den für jeden der drei Gipfel mit Hilfe der digitalen Impulsanzeige des Szintillationszählers ermittelten Einzelwerten. Bei sechs Injektionen (von Aliquoten derselben Probe) lag der

Anteil der MGSDME an der Gesamtradioaktivität zwischen 17,7 und 18,5 % (Mittelwert 18,2 %). D.h. aber, daß im enzymatsich hergestellten ^{14}C-HMG-CoA-Präparat ^{14}C-Methylglutaconyl-CoA 18,2 % und ^{14}C-HMG-CoA 81,8 % der Gesamtradioaktivität enthält; und für diesen Anteil des ^{14}C-HMG-CoA wurden mit diesem Verfahren $7{,}03 \cdot 10^7$ dpm/ml gefunden. Nimmt man an, daß bei der enzymatischen Bildung von HMG-CoA das Gleichgewicht der von Methylglutaconyl-CoA-Hydratase katalysierten Reaktion erreicht wurde, dann läßt sich die Gleichgewichtskonstante zu

$$K_{eq.} = \frac{[\text{HMG-CoA}]}{[\beta\text{-Methylglutaconyl-CoA}]} = \frac{81{,}8}{18{,}2} = 4{,}5$$

berechnen. Derselbe Wert wurde auf andere Weise bereits früher erhalten (123).

Die Identität der obengenannten Radioaktivitätsgipfel wurde mit authentischen Präparaten der drei Methylester bewiesen. HMGDME ließ sich aus der Säure durch Umsetzung mit Diazomethan gewinnen und an Hand seiner Elementaranalyse (siehe Exptl. Teil S. 125) und seines NMR-Spektrums charakterisieren. Dieses Spektrum (in $CDCl_3$, Sweep-Bereich 500 Hz) besteht aus 4 scharfen Singuletts: bei τ = 5,98 (OH), τ = 6,29 ($-CO_2-CH_3$), τ = 7,32 ($-CH_2-$)und τ = 8,64 ppm ($-\overset{|}{\underset{|}{C}}-CH_3$). Wie sich bei einem Sweep-Bereich von 50 Hz erwartungsgemäß zeigte, bestehen keinerlei Kopplungen. Ein Vergleichsspektrum für HMGS (in $(CD_3)_2CO$, Sweep-Bereich 1000 Hz) zeigt ein wenig scharfes bei τ = 2,02 (-OH und zwei $-CO_2H$), sowie zwei scharfe Singuletts bei τ = 7,32 ($-CH_2-$) und τ = 8,62 ppm ($-\overset{|}{\underset{|}{C}}-CH_3$). Ein Gemisch von cis- und trans-MGS wurde nach Feist (124) synthetisiert und mit Diazomethan verestert. Das Estergemisch wurde mittels präparativer Gaschromatographie (siehe Exptl. Teil S. 126) aufgetrennt und die Ester abermals aufgrund der Elementaranalyse (siehe Exptl. Teil S. 126) und des Kernresonanzspektrums identifiziert. Der cis-Ester (Fraktion 1) wurde früher von der Gaschromatographiesäule eluiert als der trans-Ester (Fraktion 2), wie auch Abb. 41 veranschaulicht. Diese Zuordnung konnte an Hand der NMR-Spektren dieser Fraktionen vorgenommen werden. Befindet sich am β-C-Atom des Vinylsystems eine Carbonestergruppe in cis-Stellung, dann absorbieren nach Fraser und Mc Greer (125) allylständige Protonen bei tieferem Feld, als wenn die Carbonestergruppe die trans-Stellung besetzt. Analoge Feststellungen hatte Panse (126) bei den Stereoisomeren der 3-Methyl-hexen(2)-säureäthylester und 3-Methyl-penten(2)-säureäthylester getroffen. Tab. 4 (S. 62) gibt die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten für die beiden MGSDME und das MGS-Anhydrid (Darstellung siehe Exptl. Teil, S. 125) wieder, wie sie aus den NMR-Diagrammen (Abb. 42–44 S. 63) zu entnehmen waren.

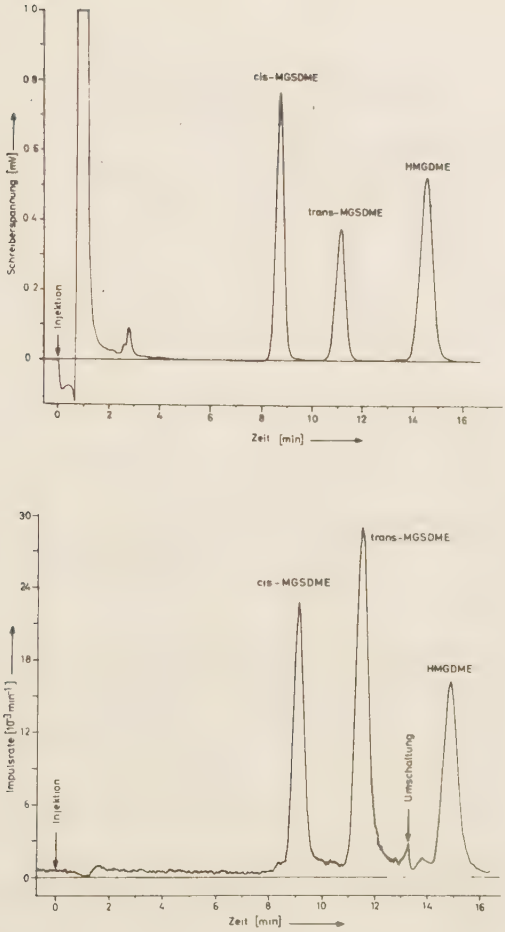


Abbildung 41

Radiogaschromatographie von [5-^{14}C]-MGSDME und [1-^{14}C]-HMGDME

a) Massendiagramm (oberes Diagramm).

b) Radioaktivitätsdiagramm (unteres Diagramm).
Der Pfeil mit der Bezeichnung "Umschaltung" markiert den Zeitpunkt, zu dem die Empfindlichkeit der Radioaktivitätsanzeige um den Faktor 10 verkleinert wurde; d.h. Vollausschlag wäre jetzt bei $3 \cdot 10^5$ Imp./min erreicht gewesen.

Tabelle 4

Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten von cis- und trans-MGSDME und MGS-Anhydrid

Protonen	Chemische Verschiebung τ ppm MGSDME cis	MGSDME trans	MGS-Anhydrid
C=C-H	4,15	4,28	3,97
C=C-CH_2-	6,26	6,90	6,51
C=C-CO_2CH_3	6,31	6,33	-
C=C-C-CO_2CH_3	6,32	6,35	-
C=C-CH_3	8,03	7,80	7,91

Kopplung	Kopplungskonstanten |J| Hz MGSDME cis	MGSDME trans	MGS-Anhydrid
H-CH_3	1,45	1,30	1,45
H-CH_2	0,60	0,90	1,45
CH_3-CH_2	-	-	1,00

Die chemischen Verschiebungen der Protonen des MGS-Anhydrids stimmen erwartungsgemäß eher mit denen der entsprechenden cis-Ester-Protonen überein als mit denen der trans-Ester-Protonen.

Jackman und Wiley (127) hatten ähnliche Werte für die chemischen Verschiebungen der beiden Ester angegeben. Die in den Abb. 42-44 eingeblendete, bei hoher Auflösung aufgedeckte Bandenstruktur läßt sich mit Hilfe der angegebenen Kopplungskonstanten leicht nachvollziehen. So entsteht z.B. die Bande A' in Abb. 42 durch Überlagerung der Gipfel, wenn das Signal des Vinylprotons durch weittragende Kopplung mit den 3 Protonen der cis-ständigen Methylgruppe in ein Quadruplett (J_{H-CH_3} = 1,45 Hz) aufgespalten wird und aus diesen Linien wiederum (weittragende Kopplung mit den allylständigen Methylenprotonen J_{H-CH_2} = 0,60 Hz) jeweils ein Triplett gebildet wird.

Die solcherart charakterisierten Ester dienten – wie auch S. 60 erwähnt – der Zuordnung der Radioaktivitätsgipfel in Abb. 41b, S. 61. Dazu wurden aliquote Teile einer Lösung des [1-^{14}C]-HMGDME und der beiden [5-^{14}C]-MGSDME der Radiogaschromatographie unterworfen. Zunächst erschienen wegen der äußerst geringen Massen nur 3 Gipfel im Radioaktivitätsdiagramm, nicht aber im Massendiagramm (WLD). Vor aufeinanderfolgenden Injektionen wurde nun der Reihe nach jeweils einer der unmarkierten Ester zugesetzt. Entsprechend seiner Retentionszeit trat jetzt auch im Massendiagramm ein Gipfel auf, dem einer der Radioaktivitätsgipfel entsprach. Die auf diese Weise erzeugten Massengipfel hatten die gleichen Abstände voneinander wie die

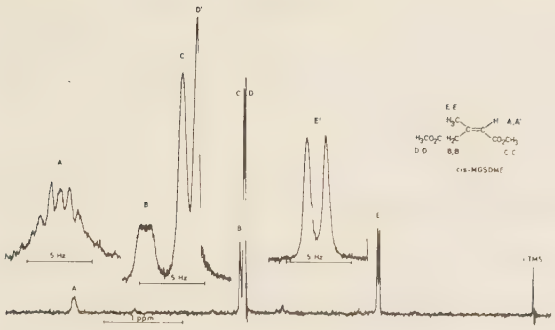


Abbildung 42

NMR-Spektrum von cis-MGSDME (in $CDCl_3/CCl_4$)

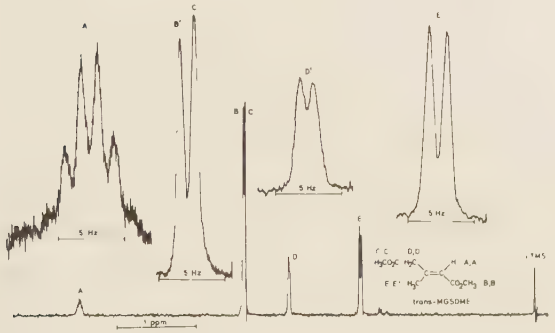


Abbildung 43

NMR-Spektrum von trans-MGSDME (in CCl_4)

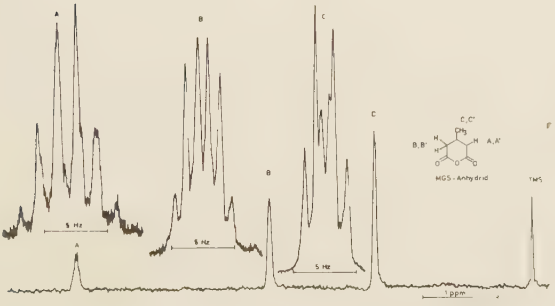


Abbildung 44

NMR-Spektrum von MGS-Anhydrid (in $CDCl_3$)

Sweep-Bereich bei allen drei Spektren 500 Hz. Die eingesetzten, mit einem gestrichenen Buchstaben bezeichneten Banden wurden mit einem Sweep-Bereich von 50 Hz aufgenommen.

Radioaktivitätsgipfel. Ferner stimmten die Retentionszeiten von einander zugeordneten Massen- und Radioaktivitätsgipfeln überein bis auf die Zeit, die zwischen Massen- und Radioaktivitätsdetektion einer Substanz wegen der räumlichen Trennung der Detektoren verstreicht (Exptl. Teil S. 128).

3. HMG-CoA-Gehalt der [5-^{14}C]-HMG-CoA-Lösung

Um die spezifische Radioaktivität der ^{14}C-HMG-CoA-Lösung berechnen zu können, muß man noch deren HMG-CoA-Konzentration ermitteln. Ich bediente mich dazu eines gekoppelten enzymatischen Tests, dessen Prinzip bereits früher von Knappe (128) angegeben wurde: Das aus HMG-CoA mit HMG-CoA-Lyase (E.C.4.1.3.5) freigesetzte Acetyl-CoA wird mit Hilfe der Citratsynthase(E.C.4.1.3.7)-Reaktion bestimmt. Dabei wurde das von Buckel und Eggerer (129) angegebene Verfahren benützt, das dem vorgeschalteten Malatdehydrogenase-Gleichgewicht Rechnung trägt und so gerade bei kleinen Acetyl-CoA (und damit HMG-CoA) -Konzentrationen wie im vorliegenden Fall, große Fehler vermeidet.

Abb. 45 zeigt das Ergebnis einer Konzentrationsbestimmung an der [5-^{14}C]-HMG-CoA-Lösung, deren Herstellung und Radioaktivitätsbestimmung bereits geschildert wurden.

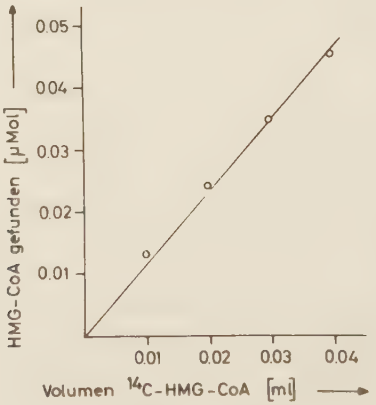


Abbildung 45

Abhängigkeit der mit Hilfe eines optischen Tests gefundenen HMG-CoA-Menge vom eingesetzten Volumen der HMG-CoA-Lösung

Aus der oben genannten Radioaktivität des Präparates von $7{,}03 \cdot 10^7$ dpm/ml und der Konzentration von 1,18 µMol/ml errechnet man eine spezifische Radioaktivität von $5{,}96 \cdot 10^7$ dpm/µMol . Diese Berechnung setzt voraus, daß in der ^{14}C-HMG-CoA-Lösung alles ^{14}C-HMG als CoA-Ester und nicht infolge Hydrolyse teilweise als freies ^{14}C-HMG vorliegt. Denn das zur Radioaktivitätsbestimmung verwendete Verfahren kann nicht zwischen freiem ^{14}C-HMG und seinem CoA-Ester unterscheiden.

4. Radiogaschromatographische Analyse der Ansätze zur Ermittlung der Reduktase-Aktivität

Außer der nach hoher Empfindlichkeit sollte dieses neue Verfahren eine weitere Forderung erfüllen: Es sollte weniger Zeit benötigen als die bisher verwendeten (57,61). Nachdem die Aufarbeitungsprozedur sich auf die im Exptl. Teil geschilderten Schritte beschränken ließ, war weitere Zeiteinsparung in der Gaschromatographie möglich. Erste Versuche hatten gezeigt, daß MVL auf NPGS-Säulen (1,5 m lang) auch bei 190° Säulentemperatur Retentionszeiten über 20 min besitzt. Es schien aber wünschenswert, mindestens 4 Analysen pro Stunde durchzuführen. Dies wäre natürlich durch Erhöhung der Durchflußgeschwindigkeit des Trägergases möglich gewesen. Aber damit fällt die Aufenthaltszeit des radioaktiven CO_2 in der Durchflußzelle (es sollte ein kontinuierliches Meßverfahren entwickelt werden, bei dem Masse und Radioaktivität nahezu gleichzeitig bestimmt werden) und damit die Empfindlichkeit des Verfahrens. Ich griff deshalb auf die Trimethylsilierung zurück, eine Methode, die in den letzten Jahren vielfach verwendet wird, um schwerflüchtige OH-Gruppen-haltige Substanzen der Gaschromatographie zugänglich zu machen. So hatten z.B. Wells und Mitarbeiter (130,131) Sterole bzw. Zucker nach Trimethylsilierung gaschromatographisch trennen können. Der Trimethylsilyläther des MVL (MVLTMS) war, wie vermutet, leichtflüchtig und unpolar genug, um eine schnelle Analysenfolge zu ermöglichen.

Bei der Reaktion des MVL mit einem Trimethylsilierungsagens, welches wie das von Wells et al. (131) beschriebene TMCS und HMDS in Pyridin enthält, entsteht Ammonchlorid als feinkristalliner Niederschlag. Das extrahierte MVL ist, da sehr hygroskopisch, stets von Wasser begleitet, dessen Reaktion mit dem Agens den Niederschlag verstärkt. Das Ammonchlorid gelangt bei der nachfolgenden Gaschromatographie auf die Trennsäule und verschlechtert allmählich die Qualität der Gaschromatogramme, indem es das Lösungsmittel Pyridin in zunehmendem Maße auf der Säule zurückhält,

ohne aber im übrigen die Trenneigenschaften der Säule zu beeinträchtigen. Zusatz einer kleinen Menge BTMSAA (Darstellung siehe (132)) löst den Niederschlag rasch auf und beseitigt dessen unangenehme Wirkung. Aus Ammonchlorid entsteht wieder HMDS, während BTMSAA, je nach Menge des NH_4Cl, in Trimethylsilylacetamid oder Acetamid übergeht.

Ein Überschuß von BTMSAA, der die im Exptl. Teil angegebene Menge übersteigt, muß vermieden werden, da er neben MVLTMS aus MVL ein zweites Produkt entstehen läßt, das im Massendiagramm – und natürlich auch im Radioaktivitätsdiagramm – einen Gipfel vor dem MVLTMS-Gipfel erzeugt. Möglicherweise ist diese störende Substanz der Bis(-trimethylsilyl)-äther der Enolform des MVL. Theilacker et al. (133) beobachteten nämlich eine solche Enolisierung bei einem vergleichbaren γ-Lacton. Dem Effekt wurde hier aber nicht weiter nachgespürt, da die Substanz bei Einhaltung der Vorschrift nicht entsteht.

Das Massendiagramm (Abb. 46a) enthält nur zwei Gipfel. Der erste, mit einer Retentionszeit von ca. 4,6 min, entspricht dem inneren Standard TDSME, der zweite, Retentionszeit ca. 6,8 min, wird von MVLTMS verursacht. Alle anderen Substanzen, die in der injizierten Mischung enthalten sind, erscheinen im Lösungsmittelgipfel: TMCS, HMDS, Mono- und Bis-(trimethylsilyl)-acetamid und Acetamid. Die Trimethylsilierungsprodukte der aus den CoA-Estern durch Hydrolyse entstandenen Verbindungen HMG und cis- und trans-MGS reichen mengenmäßig nicht aus, einen Massengipfel zu erzeugen. Sie verraten ihre Gegenwart aber im entsprechenden Radioaktivitätsdiagramm (Abb. 46b) an Stellen, wo sie die quantitative Analyse nicht stören. Der mit MGS bezeichnete Gipfel entspricht dem TMS-Produkt eines der geometrischen Isomeren (cis oder trans) der MGS. Der folgende mit HMG bezeichnete Gipfel rührt von Tris(-trimethylsilyl)-HMG her. Der Gipfel des trimethylsilierten anderen geometrischen Isomeren von MGS (trans oder cis) liegt unter der auslaufenden Flanke des HMG-Gipfels. Dies wurde folgendermaßen nachgewiesen: Zunächst führte ich die gaschromatographische Analyse eines solchen Gemisches bei einer derart niedrigen Säulentemperatur aus, daß sämtliche vier Komponenten vollständig getrennt wurden. Vier Radioaktivitätsgipfel traten im entsprechenden Diagramm auf. Deren letzter konnte aufgrund seines Massengipfels sofort MVLTMS zugeordnet werden. Wurde nun der Mischung eine kleine Menge nichtradioaktiver HMGS zugesetzt, so erschien im Massendiagramm an einer Stelle ein neuer Gipfel, der dem Gipfel 2 im Radioaktivitätsdiagramm entsprach.

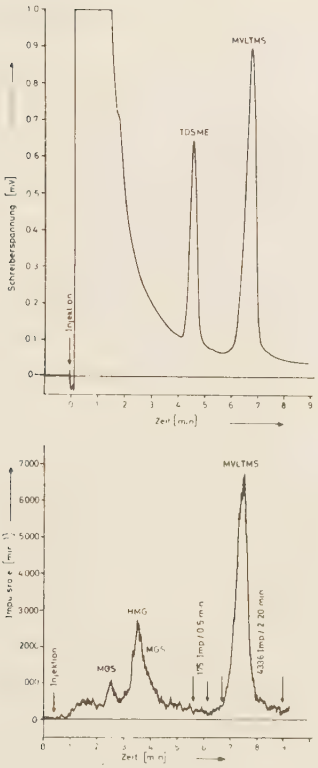


Abbildung 46a

Massen-Gaschromatogramm zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität

Abbildung 46b

Zugehöriges Radioaktivitäts-Gaschromatogramm

Zusatz eines Gemisches von cis- und trans-MGS ließ im Massendiagramm zwei weitere Gipfel auftauchen, denen Gipfel 1 und 3 im Radioaktivitätsdiagramm entsprachen. Analysierte man diese Mischung nun jedesmal bei stufenweise erhöhter Säulentemperatur: so rückten sämtliche Gipfel immer weiter zusammen, wobei schließlich bei 190°, der normalerweise verwendeten Säulentemperatur, Massengipfel 2 und 3 nur noch schwach getrennt auftraten; im zugehörigen Radioaktivitätsdiagramm aber waren die entsprechenden Gipfel bereits verschmolzen. Auf dem Weg von der Massen- zur Radioaktivitätsdetektion verbreitern sich natürlich alle Gipfel; was in diesem Fall dazu führte, daß im

Massendiagramm zwei nahe beieinanderliegende Gipfel noch getrennt erschienen, nicht mehr aber im Radioaktivitätsdiagramm.

Die Natur der TMS-Produkte von HMG und MGS wurde nicht streng bewiesen. Dazu wären z.B. Synthese, chemische Analyse und NMR-Spektrum notwendig gewesen. Da freie Dicarbonsäuren sehr schwerflüchtig sind und wegen ihrer Polarität eine Polyestersäule nur langsam durchwandern würden, zudem die Trimethylsilierung verwandter Säuren unter ähnlichen Bedingungen bereits früher (132) gefunden wurde, und der Beweis für die Sicherung der Methode nicht entscheidend ist, verzichtete ich auf diesen Beweis. Die Untersuchungen über MVLTMS wurden bereits in Kapitel III, S. 54 mitgeteilt.

Die 3 verschmolzenen Radioaktivitätsgipfel zu Beginn des Diagramms 46b erschienen auch, wenn die vorhergehende Inkubation ohne Microsomen ausgeführt wurde. D.h. die entsprechenden Carbonsäuren verdanken ihre Entstehung aus den CoA-Estern in erster Linie spontaner Hydrolyse und weniger der Aktivität einer Hydrolase.

5. Eichung der gaschromatographischen Massenbestimmung von MVLTMS

Um von Schwankungen der Ansprechempfindlichkeit des Wärmeleitfähigkeitsdetektors gegenüber einer bestimmten Substanzkonzentration im Trägergasstrom unabhängig zu sein, wird zur gaschromatographischen Massenbestimmung von MVLTMS ein innerer Standard verwendet.

Voraussetzung für die Brauchbarkeit der Methode ist, daß Änderungen in der Empfindlichkeit der Massendetektion zu bestimmende Substanz und inneren Standard gleichsinnig und in gleichem Maße betreffen. Die Berechtigung dieser Annahme habe ich nicht experimentell bewiesen, sondern mich auf Literaturangaben (134) gestützt. TDSME erwies sich als innerer Standard sehr geeignet, da er allen Anforderungen genügt, die an einen solchen zu stellen sind (134).

Das Ziel der Eichung ist die Bestimmung eines Eichfaktors f, der die unterschiedliche Ansprechempfindlichkeit des Massendetektors für gleiche Massen verschiedener Substanzen kennzeichnet. Er läßt sich aus folgender Gleichung berechnen:

$$\frac{G_{MVLTMS}}{F_{MVLTMS}} = f \cdot \frac{G_{TDSME}}{F_{TDSME}} \qquad (21)$$

Darin bedeuten:

G_i = Gewicht der in den Gaschromatographen injizierten Menge der Substanz i.

F_i = Fläche des von dieser Masse erzeugten Gipfels im Gaschromatogramm.

Die Eichung besteht nun darin, den Faktor f als Funktion von G_{MVLTMS} bei möglichst konstantem G_{TDSME} zu ermitteln (siehe Exptl. Teil, S. 134).

In Abb. 47 ist der Faktor f über der Gewichtsmenge des injizierten MVLTMS aufgetragen. Wie man sieht, ist f in diesem Fall über einen weiten Bereich von der applizierten MVLTMS-Menge unabhängig. Die Menge an Träger-MVA, die am Ende der Inkubationszeit dem HMG-CoA-Reduktase-Ansatz beigefügt wurde, ist so gewählt, daß die Messungen in diesen Bereich des konstanten Eichfaktors fallen.

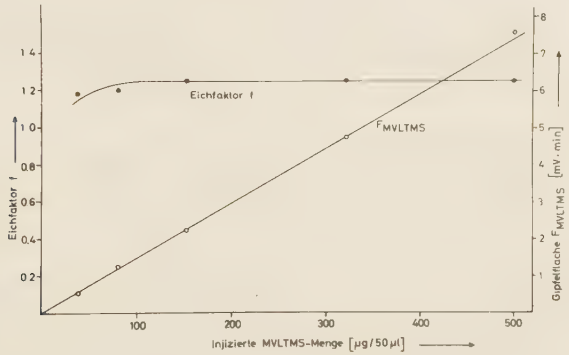


Abbildung 47

Abhängigkeit des Eichfaktors f und der Fläche des MVLTMS-Massensignals von der injizierten MVLTMS-Menge.

Bei einem anderen Wärmeleitfähigkeitsdetektor nahm der Faktor jedoch linear mit der MVLTMS-Masse ab, d.h. es gab keinen Bereich, in dem f von G_{MVLTMS} unabhängig war. Derselben Abbildung ist ferner zu entnehmen, daß die Fläche des MVLTMS-Massengipfels proportional der eingespritzten Menge zunimmt.

Bei der Analyse der Versuchsproben wird zunächst die Fläche des MVLTMS-Signals im Massendiagramm bestimmt, dann mit Hilfe der Ursprungsgeraden in Abb. 47 die ungefähr zugehörige Masse und daraus an Hand der Eichkurve für f der Eichfaktor ermittelt; "ungefähr zugehörig" deshalb, weil ja die Ansprechempfindlichkeit des Detek-

tors sich inzwischen gegenüber der zur Zeit der Aufnahme des Eichdiagramms herrschenden verändert haben kann. Aus der entsprechend umgeformten Gl. (21) kann dann mit den bekannten Werten von G_{TDSME} (bekannte Menge im TMS-Agens enthalten) und F_{TDSME} (aus dem Gaschromatogramm entnommen) der genauere Wert von G_{MVLTMS} berechnet werden.

6. Berechnung der spezifischen Aktivität der Reduktase

Die spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase, ausgedrückt in der Form: µMol MVA gebildet pro mg Microsomenprotein pro Stunde, läßt sich aus einer größeren Zahl von Meßwerten und Konstanten berechnen. Man erkennt, daß in dem Ausdruck für die spezifische Aktivität A:

$$A = \frac{C_{MVA} \cdot V_{MVA} \cdot M \cdot V_{TDSME} \cdot 60 \cdot V_{ges.} \cdot A_{TDSME}}{z \cdot G_{TDSME} \cdot V_i \cdot s \cdot V_Z \cdot V_{TMS} \cdot A_{MVLTMS} \cdot t_R} \cdot \frac{(I_{ges.} - i_u \cdot \frac{t_{ges.}}{t_u}) \cdot V_S \cdot h_{TDSME} \cdot b_{TDSME}}{f \cdot t_S \cdot E \cdot V_A \cdot h_{MVLTMS} \cdot b_{MVLTMS}} \qquad (22)$$

auch die Größen enthalten sind, durch die G_{MVLTMS} nach Gl. (21) bestimmt wird, denn $F_i = b_i \cdot h_i$ (i = MVLTMS bzw. TDSME). Dabei sind (Die Zahlen in der runden Klammer geben jeweils den Wert an, den die entsprechende Größe im Versuch der Abb. 46, S. 67 annimmt. Diese Angaben sollen einen Begriff von der Größenordnung der Werte geben, die bei einer solchen typischen Analyse auftreten):

$A\ [\mu Mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}]$: Spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase (0,0104)

$C_{MVA}\ [\mu Mol \cdot ml^{-1}]$: Konzentration der Trägermevalonatlösung (44,35)

$V_{MVA}\ [ml]$: Am Ende der Inkubation zugesetztes Vulumen der Trägermevalonatlösung (0,226)

$M\ [\mu g \cdot \mu Mol^{-1}]$: Molekulargewicht des Mevalolactontrimethylsilyläthers (202,94)

$V_{TDSME}\ [\mu l]$: Volumen des Trimethylsilierungsagens, in dem die Menge G_{TDSME} des inneren Standards gelöst wurde (25000)

60 [sec · min^{-1}]:	Umrechnungsfaktor von min auf sec
$V_{ges.}$ [µl]:	Gesamtvolumen an Trimethylsilierungsagens, in dem Mevalolacton-trimethylsilyläther nach Bis-(trimethylsilyl)-acetamid-Zugabe gelöst vorliegt (200)
A_{TDSME}:	Attenuatorstufe, mit der das Tridecansäuremethylester-Massensignal des Wärmeleitfähigkeitsdetektors abgeschwächt wurde, bevor es auf den Schreibereingang gegeben wurde (8)
z:	Zählausbeute in der Durchflußszintillationszelle bei stationärem Betrieb, angegeben in Bruchteilen von 1 (0,49)
G_{TDSME} [µg]:	Menge des inneren Standards Tridecansäuremethylester, die im Volumen V_{TDSME} des Trimethylsilierungsagens enthalten ist (49000)
V_i [µl]:	Volumen des Aliquots, das dem Volumen $V_{ges.}$ zur Injektion in den Gaschromatographen entnommen wird (50)
s [µMol^{-1}.min^{-1}]:	Spezifische Radioaktivität des Substrates [5-^{14}C]-HMG-CoA ($5{,}96 \cdot 10^7$)
V_Z [ml]:	Freies Gasvolumen der Durchflußszintillationszelle (5,75)
V_{TMS} [µl]:	Volumen Trimethylsilierungsagens (Aliquot des Volumens V_{TDSME}), in dem das extrahierte Mevalolacton vor der Gaschromatographie gelöst wird (190)
A_{MVLTMS}:	Beim Registrieren des Mevalolactontrimethylsilyläther-Massensignals verwendeter Abschwächungsfaktor (s.o. bei A_{TDSME}) (8)
$I_{ges.}$:	Unter dem Radioaktivitätssignal des Mevalolactontrimethylsilyläthers integrierte Gesamtimpulszahl (4336)
i_u:	Untergrundimpulse, gemessen vor dem Radioaktivitätssignal des Mevalolactontrimethylsilyläthers (175)
$t_{ges.}$ [min]:	Zeit, während der $I_{ges.}$ gemessen wurde (2,20)
t_u [min]:	Zeit, während der i_u gemessen wurde (0,50)
V_S [ml]:	Volumen, das die Seifenlamelle des Seifenblasen-Gasfluß-Geschwindigkeitsmessers während der Zeit t_S durchstreift (10,0)
t_S [sec]:	Zeit, die die Seifenlamelle benötigt, um das Volumen V_S des Seifenblasen-Gasfluß-Geschwindigkeitsmessers zu durchstreifen (23,9)

h_{TDSME} [cm]:	Höhe des Massensignals von Tridecansäuremethylester im Gaschromatogramm (13,0)
b_{TDSME} [cm]:	Breite des Massensignals von Tridecansäuremethylester in halber Höhe des Gipfels (0,49)
f:	Eichfaktor (siehe Abb. 47, S. 69) (1,26)
E [$mg \cdot ml^{-1}$]:	Proteinkonzentration der Microsomensuspension, die in den Test eingesetzt wird (10,0)
V_A [ml]:	Für die Inkubation eingesetztes Volumen der Microsomensuspension (0,040)
t_R [h]:	Reaktionszeit (1,00)
h_{MVLTMS} [cm]:	Höhe des Mevalolactontrimethylsilyläther-Massengipfels im Gaschromatogramm (19,7)
b_{MVLTMS} [cm]:	Halbwertsbreite des Mevalolactontrimethylsilyäther-Massengipfels (0,71)
$V_{ink.}$ [ml]:	Inkubationsvolumen (0,200)

Die Berechnung des Endergebnisses erfordert einen gewissen Aufwand an Rechenarbeit auch dann noch, wenn eine beträchtliche Anzahl von Größen zu Beginn in einer einmalig zu berechnenden Konstante zusammengefaßt werden kann (erster Bruch in Gl. (22)). Ich bin deshalb dazu übergegangen, größere Meßreihen mit Hilfe einer elektronischen Rechenanlage auszuwerten. Abb. 62 (Exptl. Teil, S. 136) gibt das dafür geschriebene ALGOL-Programm wieder,das es erlaubt, wenn Bedarf, zusätzliche Rechnungen bei Enzym-, Zeit- und Substratabhängigkeit der Mevalonatbildung aus HMG-CoA durchzuführen. Abb. 48 zeigt einen kurzen Ausschnitt der Datenausgabe (5. Spalte: spezifische Aktivität, 6. Spalte: Mittelwert aus je 3 Werten – entsprechend 3 Parallelinjektionen bei der Gaschromatographie – der 5. Spalte).

Über Ergebnisse, die mit Hilfe dieses Testverfahrens erhalten wurden, wird in den folgenden Kapiteln berichtet.

N	JIM	TJIM(MIN)	VEIP(ML)	TSEIF(SEC)	SPEZAK(UMOL/MG/M)	DRIT(UMOL/MG/M)
46	149	0.50	10.0	24.6	0.01346	
47	189	0.50	10.0	24.6	0.01412	
48	200	0.50	10.0	24.7	0.01365	0.01374
49	169	0.50	10.0	24.5	0.01373	
50	158	0.50	10.0	24.5	0.01395	
51	186	0.50	10.0	24.4	0.01384	0.01384
52	172	0.50	10.0	24.5	0.01400	
53	186	0.50	10.0	24.6	0.01399	
54	199	0.50	10.0	24.5	0.01394	0.01397
55	163	0.50	10.0	24.5	0.01283	
56	165	0.50	10.0	24.5	0.01229	
57	150	0.50	10.0	24.5	0.01429	0.01314
58	178	0.50	10.0	24.4	0.01260	
59	178	0.50	10.0	24.5	[illegible]	
[illegible]	142					

Abbildung 48

Ausschnitt aus der Datenausgabe nach Berechnung der Analysenergebnisse durch die elektronische Rechenanlage TR4.

V. Eigenschaften der membrangebundenen HMG-CoA-Reduktase

1. Einflüsse der Inkubationspartner auf die Reduktase-Aktivität

Microsomenkonzentration. Um festzustellen, ob die Bildung von ^{14}C-Mevalonat aus ^{14}C-HMG-CoA der Enzymkonzentration proportional ist, wird die Enzymaktivität [µMol/ml/h] über der Konzentration an Microsomenprotein [mg/ml] aufgetragen. Abb. 49 zeigt das Ergebnis dreier Versuche mit unterschiedlich aktiven Microsomenpräparaten. In keinem Fall ist Proportionalität zwischen Proteinkonzentration und Aktivität über eine Konzentration von 1 mg/ml hinaus gegeben. Kurve I läßt sich noch ohne großen Fehler durch eine Gerade ersetzen. Und aufgrund dieser Kurve war entschieden worden, weitere Untersuchungen mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml auszuführen. Die Kurven II und III wurden erst in einem späteren Stadium dieser Arbeit aufgenommen und geben berechtigten Zweifeln Raum, ob die Proteinkonzentration richtig gewählt war. Auf den Grund dafür, daß die Kurven ein Plateau anstreben, wird später (S. 78) eingegangen.

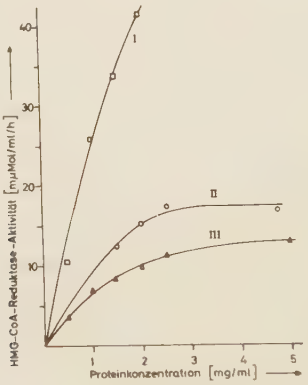


Abbildung 49

Abhängigkeit der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität von der in den Test eingesetzten Enzymmenge.

HMG-CoA-Konzentration. Abb. 50 zeigt die Abhängigkeit der Reduktase-Aktivität von der Konzentration eines der beiden Substrate, beobachtet an drei verschieden aktiven Microsomenpräparaten. Aus den Kurven lassen sich Substratkonzentrationen bei halbmaximaler Aktivität von ca. 2 bis 6 · 10^{-5} M ablesen. Bei den Routineuntersuchungen

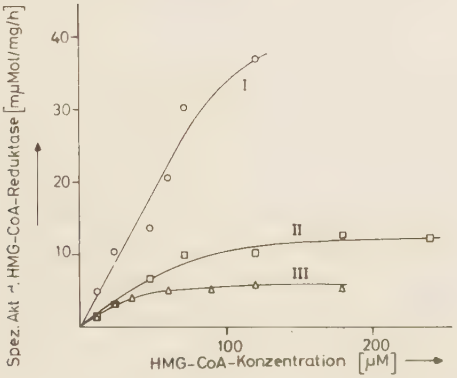


Abbildung 50

Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Reduktase von der HMG-CoA-Konzentration. (Exptl. Einzelheiten, S. 143).

wurde – um kostbares [5-^{14}C]-HMG-CoA zu sparen – nicht im Substratsättigungsbereich gearbeitet, sondern mit einer HMG-CoA-Konzentration von 7,5 · 10^{-5} M . Auffallend ist zunächst, daß die Substratsättigung umso früher erreicht wird, je geringer die Aktivität des Präparates ist. Bedenkt man aber, daß den 3 Meßpunkten bei 120 μM HMG-CoA-Konzentration Umsätze von 62, 17 und 10 % in 1 h entsprechen, so wird klar, daß dieser HMG-CoA-Spiegel bei hohem Umsatz nur zu Inkubationsbeginn herrscht, dann aber abnimmt und mit ihm der Sättigungsgrad des Enzyms und damit die Reaktionsgeschwindigkeit. D.h. aber, daß bei höherer Reduktase-Aktivität eine größere Substratkonzentration nötig ist, um über den ganzen Inkubationszeitraum konstante Reaktionsgeschwindigkeit zu haben. Ferner sind noch andere HMG-CoA-umsetzende Enzyme an der Senkung der HMG-CoA-Konzentration beteiligt. Darauf wird später (S. 78) eingegangen.

Konzentration des Reduktionsmittels. Die enzymatische Reduktion des Thioesters zum primären Alkohol benötigt TPNH. Dieses kann der Reaktionsmischung entweder direkt

in ausreichender Konzentration zugesetzt werden oder aber in situ immer wieder aus Glucose-6-phosphat und TPN mittels Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase regeneriert werden. Im ersten Fall würde man eine höhere Konzentration an TPNH benötigen, um das Enzym während der gesamten Reaktionsdauer mit TPNH sättigen zu können, als im zweiten. Abb. 51 demonstriert, daß dies wahrscheinlich zutrifft. Die Kurven I und II, aufgenommen mit verschiedenen Microsomenpräparaten, geben die Abhängigkeit der Aktivität von der TPN-Konzentration des TPNH-regenerierenden Systems wieder. Beide Kurven erreichen bei einer TPN-Konzentration von etwa 0,8 mM ein Plateau. Bei der Standardinkubation (S. 131) wird deshalb ein TPN-Spiegel von 1,0 mM verwendet. Dieselbe Microsomensuspension wie bei Kurve II wurde für Kurve III eingesetzt; hier wurde dem Reaktionsansatz direkt TPNH zugemischt. Der Anstieg ist jetzt nicht so steil wie bei den beiden anderen Kurven. Zwar beträgt der TPNH-Verbrauch zur Reduktion bei der vorliegenden HMG-CoA-Reduktase-Aktivität nur ca. 3% einer 1 mM TPNH-Lösung, sodaß der langsamere Anstieg der Kurve III darauf zurückzuführen ist, daß Microsomen noch andere TPNH-verbrauchende Enzyme enthalten. Der Grund für den Aktivitätsschwund bei höheren Pyridinnucleotidkonzentrationen ist unbekannt; vielleicht handelt es sich um eine kompetitive Hemmung, bei der die TPNH-Molekeln sich wegen ihrer hohen Konzentration bereits gegenseitig an der Enzymoberfläche behindern. Warum aber Kurve II bei höheren TPN-Konzentrationen nicht so steil abfällt wie Kurve I, ist nicht bekannt.

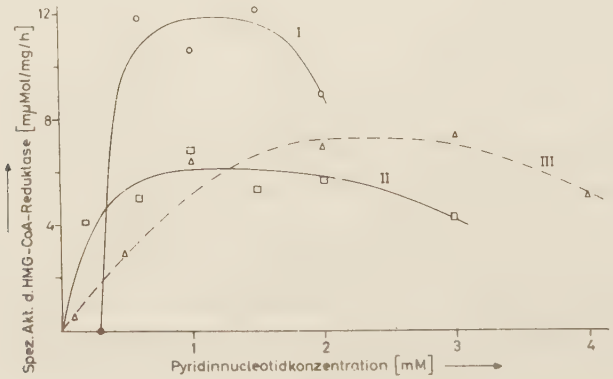


Abbildung 51

Abhängigkeit des spezifischen Aktivitätswertes der Reduktase von der Pyridinnucleotid-Konzentration.

Kurven I (○) und II (□): TPN + Glucose-6-phosphat + Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; Kurve III (△): TPNH (weitere Angaben S. 143)

Zeitabhängigkeit. Die HMG-CoA-Reduktase-Reaktion wird durch Zugabe der Microsomen gestartet. Die Reaktion beginnt zögernd, wird aber in den ersten 20 min schneller, um sich dann immer mehr abzuschwächen. Die Abb. 52a und b veranschaulichen Ergebnisse, die mit verschiedenen Microsomenpräparaten erhalten wurden. Bis zu einer Reaktionszeit von 1 h läßt sich – ohne großen Fehler – der Kurvenverlauf auch durch eine Gerade annähern. Die Kurven besitzen einen Wendepunkt.

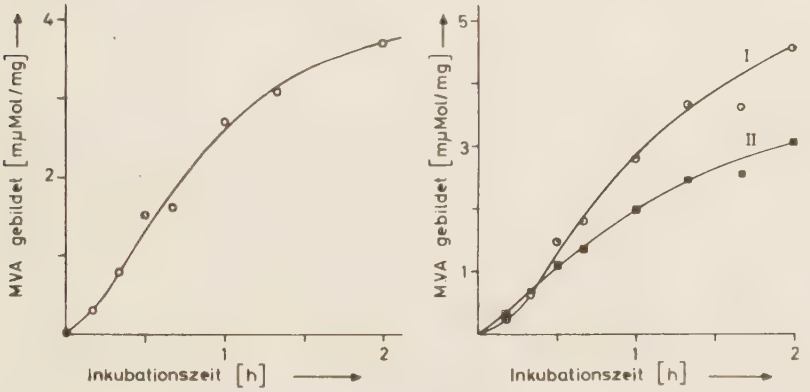


Abbildung 52a und b

Abhängigkeit der Mevalonatbildung von der Inkubationszeit (Standard-Inkubationsbedingungen). Erläuterungen siehe Text und Exptl. Teil S. 143.

An ihnen lassen sich also deutlich zwei Phasen unterscheiden: eine anfängliche Aktivierungsphase und ein Bereich nachlassender Reaktionsgeschwindigkeit. Die Aktivierung dürfte der Reduktion von Disulfidbrücken in inaktivem Enzym durch das in der Inkubationsmischung enthaltene Cystein zu verdanken sein. Über Versuche, die diese Hypothese stützen, wird weiter unten berichtet werden. Die Vermutung, daß das Nachlassen der Geschwindigkeit während der zweiten Phase abnehmender Substratsättigung des Enzyms zuzuschreiben ist, erhält mehr Gewicht durch die in Abb. 52b dargestellten Ergebnisse. Der Verlauf der Mevalonatbildung wurde bei zwei verschiedenen Microsomenkonzentrationen beobachtet. Würde genügend Substrat zur Verfügung stehen, so müßte die pro mg Microsomenprotein gebildete Mevalonatmenge unabhängig von der Enzymkonzentration sein, d.h. die beiden Kurven (I und II) in Abb. 52b müßten zu einer verschmelzen. Da dem nicht so ist, vielmehr bei höherer Enzymkonzentration (Kurve II)

der Umsatz pro Einheitsmenge des Enzyms geringer ist, ist der Schluß erlaubt, daß der mit zunehmender Reaktionszeit sich vergrößernde Unterschied zwischen den beiden Kurven seine Ursache in unterschiedlich schnellem Abfall der Substratkonzentration hat. Diese reichte ja schon bei Beginn der Reaktion nicht zur Sättigung des Enzyms aus. Auch der nivellierende Effekt höherer Enzymkonzentration, der sich darin äußert, daß die Aktivierungsphase bei höherer Enzymkonzentration (Kurve II) weniger ausgeprägt ist als bei niedrigerer (Kurve I), läßt sich ähnlich auf leicht einzusehende Weise erklären. Außer der Reduktase verbraucht in Microsomen noch die HMG-CoA-Lyase dieses Substrat (41). Möglicherweise enthalten die Partikel zusätzlich HMG-CoA-Hydrolase-Aktivität (135).

HMG-CoA-Lyase. Bereits früher (S.74 und 75) hatte sich die Aktivität der HMG-CoA-Lyase (das Enzym spaltet HMG-CoA in Acetyl-CoA und Acetacetat) als Erklärung für unerwartet niedrige Reduktase-Aktivität angeboten. Um den Einfluß dieses Enzyms auf den HMG-CoA-Spiegel der Inkubationsmischung kennenzulernen, wurde seine Aktivität mit der Acetacetatbestimmungsmethode von Walker (136) an einigen Microsomenpräparaten gemessen (Exptl. Einzelheiten S. 140).

Wie Abb. 53 zu entnehmen, ist die Menge des gebildeten Acetacetat proportional der eingesetzten Microsomenmenge. Verschiedene Microsomenpräparate differieren im Gehalt an Lyase (Vergleich Geraden I und IIa, Abb. 53). Die Acetacetatbildung wurde auch unter den Bedingungen der HMG-CoA-Reduktase-Inkubation verfolgt (IIb in Abb. 53).

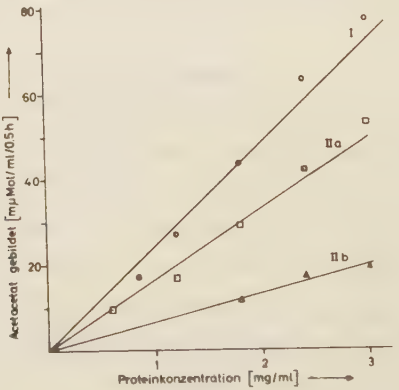


Abbildung 53

Zusammenhang zwischen Acetacetatbildung und Microsomenkonzentration

Kurven I, IIa: pH 8.0, 12 mM Mg^{2+}. Kurve IIb: pH 7.2, 24 mM EDTA. Kurven IIa und IIb wurden mit demselben Microsomenpräparat erhalten. HMG-CoA-Konzentrationen: I: 212 μM, IIa und IIb: 266 μM.

Diese Gerade verläuft wesentlich flacher als die unter den Standardtestbedingungen der Lyase erhaltene (IIa). Da gleichzeitig zwei Parameter (pH und Mg^{2+}-Konzentration) verändert wurden, kann zunächst nicht angegeben werden, wodurch dieser Unterschied verursacht wird. Abb. 54 stellt die Substratsättigungskurven der HMG-CoA-Lyase verschiedener Microsomenpräparate dar (Kurven I, IIa, III).

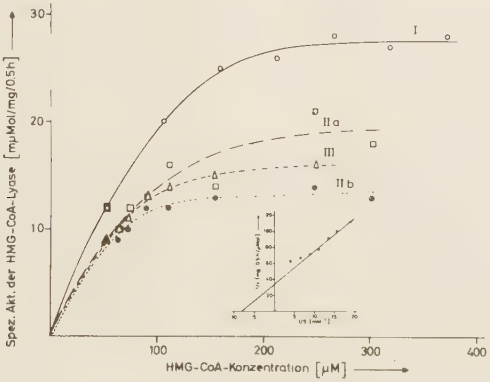


Abbildung 54

Abhängigkeit der HMG-CoA-Lyase-Aktivität von der Substratkonzentration

Kurven I, IIa, III: pH 8.0, 12 mM Mg^{2+}. Kurve IIb: pH 8.0, 24 mM EDTA. Kurven IIa und IIb wurden mit demselben Microsomenpräparat erhalten. Proteinkonzentration in allen Fällen: 2,4 mg/ml. Einsatz: Meßergebnisse zu Kurve III, nach Lineweaver und Burk (138) ausgewertet.

Man sieht (Kurven IIa und IIb), daß bei konstantem pH-Wert das Fehlen von Mg^{2+} im HMG-CoA-Sättigungsbereich einen Aktivitätsabfall um etwa ein Viertel verursacht; demnach kommt der Unterschied der Kurven IIa und IIb (Abb. 53) zu etwa gleichen Teilen durch Mg^{2+}-Mangel und pH-Änderung zustande. Diese Abnahme ist weit geringer als die von Bachhawat et al. (137) über dasselbe Enzym aus Schweineherz berichtete (ca. 90%). Aus der Lineweaver-Burk-Darstellung (138) der Ergebnisse, die Kurve III (Abb. 54) zugrunde liegen, läßt sich eine Michaeliskonstante von ca. $1 \cdot 10^{-4}$ M ableiten.

Die Kurven II in Abb. 49, II in Abb. 50, IIb in Abb. 53 und III in Abb. 54 wurden mit derselben Microsomenpräparation erhalten. Es läßt sich aus den drei letztgenannten Kurven berechnen, daß unter den Standard-Inkubationsbedingungen der Reduktasebe-

stimmung (HMG-CoA-Konzentration: 75 µM; Proteinkonzentration: 2 mg/ml, Reaktionszeit: 1 h) beide Enzyme (Reduktase, Lyase) etwa gleich viel HMG-CoA verbrauchten, zusammen etwa die Hälfte der eingesetzten Menge. D.h. während der Inkubation sinkt laufend der Sättigungsgrad der Reduktase und damit die Reaktionsgeschwindigkeit. Es lassen sich somit die Befunde, daß die beobachtete HMG-CoA-Reduktase-Aktivität nur in einem niedrigen Bereich der Microsomenkonzentration proportional ist (Abb. 49) und daß die Mevalonatbildung nur kurze Zeit (wenn man von der Aktivierungsphase absieht) der Reaktionszeit proportional ist (Abb. 52) tatsächlich mit solcher Abnahme der Substratsättigung erklären.

MVA-Zusatz. Mindestens zwei Effekte von unmarkiertem MVA auf die Reduktion von radioaktiv markiertem HMG-CoA sind denkbar. a) Zusatz unmarkierten Mevalonats erhöht die Ausbeute an ^{14}C-MVA. Wegen Isotopenverdünnung des gerade gebildeten ^{14}C-MVA würde eine möglicherweise vorhandene Mevalonatdehydrogenase in erster Linie unmarkiertes Substrat oxydieren. In Abwesenheit des MVA-Vorrats aber würde ^{14}C-MVA dehydriert werden. b) Zusatz von MVA senkt die Ausbeute an ^{14}C-MVA, weil es die Reduktase hemmt. Wie Tab. 5 zeigt, tritt keine der beiden erwogenen Wirkungen auf, MVA-Zusatz zum Reduktase-Test hat keinen Einfluß auf die Aktivität. Es existiert somit keine MVA-Dehydrogenase-Aktivität im Microsomenpräparat und MVA hemmt seine eigene Entstehung nicht.

Tabelle 5

Einfluß von MVA und EDTA auf die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität. Standard-Inkubationsbedingungen.

Probe Nr.	Zusatz	Konzentration des Zusatzes in der Testmischung mM	Spez. Aktivität mµMol/mg/h	% der Aktivität von Probe 1
1	-	0	13,6	100
2	MVA	5	12,7	94
3	MVA	10	13,1	96
1	EDTA	20	11,9	100
2	-	0	9,4	79

EDTA-Zusatz. Der Zusatz dieses Chelatbildners zur HMG-CoA-Reduktase-Inkubation erhöht die Aktivität des Enzyms, wie der zweite Teil von Tab. 5 aussagt. Möglicherweise bindet EDTA Spuren hemmend wirkender Schwermetallionen.

Über die Wirkung des Cysteins, eines weiteren Inkubationspartners der Reduktase, wird im folgenden Abschnitt berichtet.

2. Die Reduktase als "SH-Enzym"

Wirkung von Reduktionsmitteln. Die oben (S. 77) geäußerte Vermutung, daß die Reduktase durch Cystein aktiviert wird (Abb. 52), ist – das zeigt die folgende Tabelle – nicht unberechtigt. In einer Inkubationsmischung, der Cystein fehlte, wurde keine Reduktase-Aktivität nachgewiesen. Wurde dem Cystein Zeit zur Autoxydation gelassen, indem es einer teilweise vorbereiteten Mischung 12 h vor der Inkubation zugefügt wurde, dann hatte es seine aktivierende Wirkung weitgehend eingebüßt.

Tabelle 6

Zur aktivierenden Wirkung von Cystein auf die Reduktase (Exptl. Einzelheiten S. 143)

Versuch Nr.	Zugabe des Cysteins	Spez.Aktivität mμMol/mg/h	% der Aktivität von Versuch 1
1	unmittelbar vor der Inkubation	2,4	100
2	12 h vor der Inkubation	0,8	33
3	kein Cystein	0,1	4

Außer Cystein wurde eine Reihe anderer Reduktionsmittel auf ihre aktivierende Wirkung untersucht. Die verschiedenen Thiole unterscheiden sich hierin nicht allzusehr. Auch die Wirksamkeit des Pyrosulfits verdient Beachtung (Tab. 7). Der geringe Effekt des Boranats könnte auch durch dessen Zersetzung unter H_2-Entwicklung gleich zu Beginn der Inkubation erklärt werden; dies wurde nicht näher untersucht. Allerdings ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zu beachten, daß die Reduktionsmittel wahrscheinlich auch die Lyase aktiviert haben (135) und dies eventuell in noch viel größerem Maße als die Reduktase. Dadurch würde der Substratmangel noch akuter und die in der

Tabelle angegebenen Werte wären das Nettoergebnis zweier gegenläufig wirksamer Vorgänge: der Erhöhung der potentiellen Aktivität und der Erniedrigung der Substratsättigung.

Tabelle 7

Einfluß verschiedener Reduktionsmittel auf die Reduktase (Exptl. Einzelheiten S. 143).

Versuch Nr.	Reduktionsmittel	Konzentration mM	Spez.Aktivität mμMol/mg/h	% der Aktivität von Versuch 1
1	Cystein	20	12,3	100
2	Glutathion	20	14,9	121
3	Dithiothreitol	20	12,2	99
4	Thioglycol	20	14,1	115
5	Ascorbat	20	0,3	2
6	KBH_4	5	0,7	6
7	$S_2O_4^{2-}$	10	7,1	58
8	$S_2O_5^{2-}$	10	8,8	72

Jodacetamidhemmung. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von SH-Gruppen für die Aktivität entstammt einem Hemmversuch mit Jodacetamid. In Abb. 55 wurde die spezifische Aktivität der Reduktase über dem Logarithmus der Konzentration des Hemmstoffes aufgetragen. Unter den Versuchsbedingungen (S. 140) ergab sich eine halbmaximale Hemmung bei ca. $2 \cdot 10^{-4}$ M Jodacetamid. Die Reduktase aus Leber verhält sich damit prinzipiell ähnlich dem entsprechenden Hefeenzym. Denn auch dieses wird durch Thiolgruppen-haltige Substanzen aktiviert und durch Jodacetamid – allerdings viel stärker – gehemmt.

Um Hinweise dafür zu gewinnen, daß die zur Enzymaktivität nötigen freien Sulfhydrylgruppen als Acceptoren für den HMG-Rest bei einer Transacylierungsreaktion fungieren, wurde untersucht, ob eine Vorinkubation der Reduktase mit HMG-CoA in Abwesenheit von TPNH die Hemmung der Reduktase bei der nachfolgenden Jodacetamideinwirkung verhindert. Tab. 8 zeigt, daß HMG-CoA nicht vor dem Jodacetamidangriff schützt. Es sieht so aus, als ob HMG-CoA ohne vorherige Übertragung des Acylrestes auf einen durch Jodacetamid blockierbaren Thiolrest des Enzyms reduziert würde und die reduktive Spaltung von Disulfidbrücken des Enzyms eine zur enzymatischen Aktivität erfor-

derliche besondere räumliche Anordnung der Enzymkette ermöglicht. Solche Verhältnisse konnten Retey et al. (139) für die HMG-CoA-Reduktase aus Hefe sehr wahrscheinlich machen.

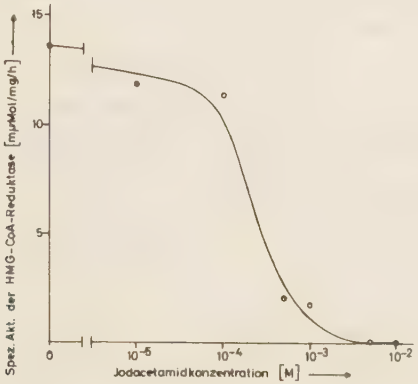


Abbildung 55 Hemmung der Reduktase durch Jodacetamid

Tabelle 8

Zur Schutzwirkung von HMG-CoA gegen JAA-Hemmung (Exptl. Einzelheiten S. 140).

Versuch Nr.	Reihenfolge der Vorinkubationen		Spez.Aktivität mμMol/mg/h	% der Aktivität von Versuch 1
	1.	2.		
1	^{14}C-HMG-CoA	-	10,6	100
2	^{14}C-HMG-CoA	JAA	0,4	4
3	-	JAA	0,2	2

3. Untersuchungen zum Fasteneffekt

HMG-CoA-Konzentration. Die Tatsache, daß die Cholesterolsynthese aus Acetat beim Fasten der Versuchstiere nahezu vollständig unterbunden ist, kann nicht auf Substratmangel der HMG-CoA-Reduktase beruhen, wie bereits früher von Bucher et al. (41) dargetan wurde. Der Versuch wurde mit höheren HMG-CoA-Konzentrationen (5 bis

25fach) als sie damals verwendet wurden, wiederholt und die Ergebnisse bestätigt. Die folgende Tab. 9 zeigt den großen Unterschied der Aktivität in Microsomen aus normal ernährten und gefasteten Tieren. Erhöhung der Substratkonzentration auf das fast 5fache hat keine Aktivitätssteigerung der Microsomen aus Hungerratten zur Folge. Damit ist klar, daß die niedrige Aktivität der Fastenmicrosomen nicht von einem zu HMG-CoA kompetitiven Inhibitor herrühren kann. Auch eine auf das Vielfache erhöhte HMG-CoA-Lyase-Aktivität in Microsomen aus Fastentieren würde bei der hohen HMG-CoA-Konzentration eine Steigerung der MVA-Bildung nicht verhindert haben und scheidet damit ebenfalls als Ursache der niedrigen Reduktase-Aktivität aus. Im übrigen hatten Bucher, Overath und Lynen (41) gefunden, daß Fastenmicrosomen nur eine etwa dreifach höhere spezifische Aktivität der Lyase besitzen als normale.

Tabelle 9

Fasteneffekt und HMG-CoA-Konzentration

Microsomen	HMG-CoA-Konzentration µM	Spez.Aktivität mµMol/mg/h
normal	75	10,6
24h Fasten	75	0,0
24h Fasten	360	0,1

Triton. Triton, ein nichtionogenes Detergens, in Ratten injiziert, erhöht die Cholesterolsynthese aus Acetat in der Leber auf das sechsfache. Aber in einem aus Microsomen und löslicher Fraktion bestehenden In-vitro-System beeinflußt, wie Bucher (140) berichtet, Triton in einem weiten Konzentrationsbereich diese Synthese nicht. Daß auch die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität durch Triton nicht verändert wird, war – wie Tab. 10, Versuchsreihen A und C zu entnehmen ist – demnach zu erwarten. Aber auch Microsomen aus Fastentieren können durch Triton nicht aktiviert werden (Tab. 10, Versuchsreihen B-D), obwohl in vivo ein solcher Effekt beobachtet wurde (21). Angenommen die Reduktase verhält sich in vitro (Microsomen sind allerdings Artefakte) nicht prinzipiell anders als in vivo; dann kann somit die Tritonwirkung im lebenden Tier nicht darauf beruhen, daß Triton etwa einen Inhibitor der Reduktase von dieser entfernt oder selber die Reduktase aktiviert. Triton muß folglich Faktoren beein-

flussen, die außerhalb der Reduktase und der Membran, deren Bestandteil sie ist, zu suchen sind, die also dem übrigen Zellraum eignen. Unterliegt die Reduktase in der Zelle raschem Auf- und Abbau, dann kann der Reduktasepegel angehoben werden, wenn die Geschwindigkeit des Abbaus relativ zu der der Enzymbildung verringert wird.

Tabelle 10

Einfluß verschiedener Tritonkonzentrationen auf die microsomale Reduktase-Aktivität normal ernährter und 30 h lang gehungerter Ratten.

Microsomen	Triton-konzentration mg/ml	Spezif.Aktivität mμMol/mg/h			
		Versuchsreihe			
		A	B	C	D
normal	0,00	1,9	-	12,3	13,6
Fasten	0,00	-	0,2	0,6	2,4
normal	0,02	2,4	-	10,7	-
Fasten	0,02	-	0,0	0,8	2,5
normal	0,05	2,3	-	-	-
Fasten	0,05	-	0,0	-	-
normal	0,10	2,8	-	13,8	-
Fasten	0,10	-	0,2	0,6	-
normal	0,50	2,6	-	8,6	-
Fasten	0,50	-	0,1	-	-
normal	1,00	2,4	-	10,7	-
Fasten	1,00	-	0,2	0,6	-

Dies könnte – bei konstanter Syntheserate – durch Hemmung der Kathepsine, durch Schutz der Reduktase vor Denaturierung bzw. Angriff durch diese Proteinasen geschehen, oder – bei konstanter Abbaugeschwindigkeit – durch Erhöhung der De-novo-Syntheserate. Die von Frantz (21) erstmals geäußerte, von Bucher (140) ausgebaute und von Siperstein (53) experimentell angegangene Hypothese läßt den Spiegel der Reduktase-Molekeln unverändert und benötigt daher zur Erklärung der Beobachtungen ein Gleichgewicht der Verteilung von Cholesterol zwischen der Reduktase und einem Lipoprotein. Aktivierung der Reduktase wäre dann möglich durch verstärkte Bindung des Cholesterols an das Lipoprotein (Tritoneffekt) oder durch Zunahme der Zahl der

Acceptor-Lipoproteinmolekeln infolge Neusynthese. Bucher (140) zieht aber eine Regulation auf der Ebene des Enzymauf- und abbaus mit gleichem Nachdruck in Betracht.

Cholesterolzusatz in kolloidaler Form (141) zum Reduktase-Test bewirkt keine Hemmung des Enzyms an Microsomen normal ernährter Tiere, wie in zwei Versuchen (Tab. 11) gefunden wurde. Damit scheidet Cholesterol als Inhibitor der Reduktase freilich noch nicht aus, denn diese Form, das Cholesterol anzubieten, braucht kein Modell zu sein für Verhältnisse in der Leberzelle.

Siperstein (15) fand keine Hemmung der Cholesterolsynthese aus Acetat, wenn er Leberschnitte in Lösungen inkubierte, die Cholesterol oder einige seiner langkettigen Fettsäureester enthielten. Ob Leberschnitte diese Stoffe überhaupt in nennenswerter Menge aus dem Medium aufnehmen, erscheint zweifelhaft.

Tabelle 11

Einfluß von Cholesterol auf die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität normal ernährter Ratten

Cholesterol-konzentration mg/ml	Spezif. Aktivität mμMol/mg/h	
	Versuch	
	A	B
0,00	1,9	12,3
0,67	1,1	13,0
0,67	1,7	-

Microsomenextrakte. Wenn die mit dem Ernährungszustand wechselnde Aktivität der microsomalen Reduktase von Hemmstoffen oder Aktivatoren herrührt, die sich an das Enzym anheften, dann sollten sich diese Stoffe extrahieren lassen. Wären sie wasserlöslich, müßten sie bereits bei der Isolierung der Microsomen weitgehend verloren gehen. Das kann aber, wie später gezeigt wird (S. 100) keineswegs der Fall sein. Sind die Stoffe aber lipoidlöslich, so müßten Extrakte aus Microsomen eventuell die Reduktase-Aktivität beeinflussen können. Microsomen aus normalen Tieren und aus Fastenratten wurden lyophilisiert und mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch extrahiert. Extrakte aus Microsomen gefütterter Ratten verliehen Fastenmicrosomen keine Reduktase-Aktivität und solche aus Fastenmicrosomen hemmten nicht die Reduktase-

Aktivität "normaler" Microsomen (Tab. 12). Exptl. Einzelheiten S. 141. Damit ist die Wahrscheinlichkeit, daß solche Aktivatoren oder Hemmstoffe für den Fasteneffekt verantwortlich sind, geringer geworden.

Tabelle 12

Einfluß von Microsomenextrakten auf microsomale Reduktase verschieden ernährter Ratten

Microsomen	Extrakt aus Microsomen	Spezif.Aktivität mμMol/mg/h
normal	-	1,5
normal	normal	1,4
normal	Fasten	1,2
Fasten	normal	0,0

Mischen von normalen und Fastenmicrosomen. Nimmt man an, daß Fastenmicrosomen relativ inaktiv sind, weil sie einen Inhibitor enthalten, daß dieser Enzym-Inhibitor-Komplex dissoziieren kann und daß der Inhibitor zwischen den Partikeln äquilibriert werden kann, dann sollte, wenn man normale Microsomen mit Fastenmicrosomen mischt, die Gesamtaktivität wesentlich geringer sein als die Summe der Aktivität der Komponenten. Das Umgekehrte müßte gelten, wenn der Besitz eines Aktivators die Ursache der enzymatischen Wirksamkeit normaler Microsomen wäre. Das Ergebnis zweier solcher Mischungsversuche (Tab. 13) ist aber: Die Aktivitäten von normalen und Fastenmicrosomen verhalten sich im Mischungsexperiment additiv, ein Befund, der inzwischen von Linn (142) bestätigt wurde. In Versuch 1 fand man 3,2 + 0,8/2 = 3,6 [mμMol/ml/h] für die Summe der Aktivitäten der Komponenten, das Gemisch zeigt einen Wert von 3,2. In Versuch 2 betrug diese Summe 15,4 + 3,6/2 17,2. Gefunden wurden experimentell: 17,2. Es sieht also entweder so aus, als ob solche Inhibitoren oder Aktivatoren nicht existierten, oder daß sie – wenn sie existieren – zwischen den verschieden aktiven Partikeln nicht ausgetauscht werden.

Tabelle 13

Mischen der Microsomen verschieden ernährter Tiere

Microsomen	Versuch 1			Versuch 2		
	Microsomen-protein mg/ml		Aktivität mμMol/ml/h	Microsomen-protein mg/ml		Aktivität mμMol/ml/h
	normal	Fasten		normal	Fasten	
normal	2	-	4,8	2	-	27,2
normal	1	-	3,2	1	-	15,4
Fasten	-	2	0,8	-	1,50	3,6
normal + Fasten	1	1	3,2	1	0,75	17,2

Um einen innigeren Kontakt der Partikel und Zellinhaltsstoffe zu erreichen, wurden deshalb Lebern normaler und gefasteter Ratten zusammen homogenisiert. Ein Stück derselben Lebern wurde zur Kontrolle, getrennt nach Ernährungsgruppen, homogenisiert (Exptl. Einzelheiten S. 141). In Tabelle 14 werden die spezifischen Aktivitäten der solcherart präparierten Microsomen verglichen: Die des Gemisches ist das arithmetische Mittel derjenigen der Komponenten – ein Ergebnis, das mit dem des vorherigen Versuches im Einklang steht.

Tabelle 14

Kohomogenisation der Lebern aus Ratten verschiedenen Ernährungszustandes

Microsomen gewonnen durch Homogenisation von	Spezif.Aktivität mμMol/mg/h
normaler Leber	2,4
Fastenleber	0,3
normaler Leber + Fastenleber	1,4

Diese Experimente beweisen nicht das Fehlen solcher Aktivatoren oder Inhibitoren. Anzunehmen, daß solche an Membranenzymen wirkende Substanzen lipophiler Natur seien, erscheint nicht abwegig. Und man weiß, daß zwischen kolloidal verteilten Lamellen praktisch kein Lipidaustausch stattfindet (143).

Einfluß der löslichen Fraktion. Die bei der Fraktionierung der Leberhomogenate anfallenden 105000g-Überstände (lösliche Fraktionen) hemmen die Umwandlung von HMG-CoA in MVA durch microsomale HMG-CoA-Reduktase vollständig, gleichgültig, ob sie aus Lebern normal ernährter oder gehungerter Ratten gewonnen wurden (Vergleich der Versuche 2 und 4 mit 1 in Tab. 15). Fastenmicrosomen werden durch die löslichen Fraktionen nicht aktiviert (Vergleich der Versuche 8 und 10 mit 7).

Tabelle 15

Einfluß der löslichen Überstände auf die Reduktase-Aktivität

Versuch Nr.	Herkunft		Behandlung des Überstands	Versuchsreihe					
	Microsomen	Überstand		A		B		C	
				S.A.[1]	%[2]	S.A.[1]	%[2]	S.A.[1]	%[2]
1	normal	-	-	2,3	100	9,4	100	16,1	100
2	normal	normal	-	0,1	4	0,1	1	0,1	0
3	normal	normal	gekocht	-	-	10,4	111	12,8	80
4	normal	Fasten	-	0,1	4	0,0	0	-	-
5	normal	Fasten	gekocht	-	-	5,6	60	13,5	84
6	normal	Fasten	gekocht u. dialysiert	-	-	-	-	16,6	103
7	Fasten	-	-	0,4	17	-	-	-	-
8	Fasten	normal	-	0,0	0	-	-	-	-
9	Fasten	normal	gekocht	-	-	0,6	6	-	-
10	Fasten	Fasten	-	0,3	13	-	-	-	-
11	-	normal	-	0,0	0	-	-	-	-
12	-	Fasten	-	0,0	0	-	-	-	-

[1] S.A. = Spezif. Aktivität mμMol/mg/h .

[2] % = % der Aktivität von Versuch 1.

Werden aber gekochte Überstände den Microsomen beigegeben, dann verhält sich das Inkubationssystem nahezu so, als seien keine Zusätze erfolgt (Vergleich der Versuche 3 und 5 mit 1). Immerhin deutet sich bei Fastenüberständen auch nach der Hitzebehandlung noch eine geringe Hemmwirkung an, die anscheinend durch Dialyse zu entfernen ist (Vergleich der Versuche 5 und 6 mit 1). Gekochte Überstände aktivieren Fastenmicrosomen nicht (Versuche 1,8,9) und die Überstände selbst zeigen ebenfalls keine Aktivität (Versuche 11 und 12).

Der kochlabile hemmende Faktor der Überstände ist sehr wahrscheinlich die HMG-CoA-Lyase, die – wie Bucher et al. (41) nachgewiesen haben – in der löslichen Fraktion enthalten ist. In der hohen HMG-CoA-Lyase-Aktivität (ob noch andere Enzyme zugegen sind, denen HMG-CoA als Substrat dient, ist unbekannt) der löslichen Fraktion ist wohl auch der Grund dafür zu suchen, daß es Siperstein und Fagan (52) nicht glückte, mit Hilfe des 10^4g-Überstandes eines Rattenleberhomogenates HMG-CoA in MVA zu verwandeln. Die Autoren ziehen aus dem negativen Ausgang des Experimentes in Verbindung mit anderen Ergebnissen den voreiligen Schluß, daß HMG-CoA kein quantitativ wichtiges Zwischenprodukt der MVA-Synthese sei und sehen in ihren Beobachtungen eine Stütze der seit vielen Jahren von Brodie, Wasson und Porter (144) geäußerten Behauptung, kovalent an Protein gebundenes HMG sei die Vorstufe von MVA. Jene anderen Resultate stammten aus Versuchen, bei denen lösliche Fraktion und Microsomen mit ^{14}C-Acetat und MVA inkubiert wurden (52,53). Auf diese Weise hatten sie nämlich radioaktives MVA erhalten. Da die Autoren keine Angaben über die HMG-CoA-Konzentration bei ihren fehlgeschlagenen Versuchen machen, kann man über die Gründe für die Diskrepanz zwischen Acetat- und HMG-CoA-Versuch nur Vermutungen anstellen.

4. Einfluß der Tageszeit auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in Rattenleber

Beim Vergleich mancher bisher besprochener Tabellen und Diagramme fällt auf, daß die spezifischen Aktivitäten der Reduktase normal ernährter Tiere von Mal zu Mal sehr verschiedene Werte besitzen; analoges gilt für die Aktivitäten der verschiedenen Microsomenpräparate aus Lebern gefasteter Ratten. Es muß deshalb erwähnt werden, daß die hier unterbreiteten Versuche sich über das ganze Jahr verteilten und daß der Tierraum von Tageslicht erhellt wurde. D.h. die Länge der Hell- und Dunkelperioden im Tierraum war abhängig von der Jahreszeit. Bei vielen Versuchen wurden die Tiere

– unabhängig von der Jahreszeit – morgens um 10^{h} geschlachtet. Ende Januar (Sonnenaufgang ca. 8.20 Uhr) wurde eine mittlere Aktivität von 9,9, Ende Mai (Sonnenaufgang ca. 4.30 Uhr) eine von nur 2,3 mμMol/mg/h gemessen. Umgekehrt brachten Tiergruppen, die im selben Monat geschlachtet wurden, umso höhere Reduktase-Aktivitäten, je früher am Tage dies geschah (Uhrzeit des Schlachtens in Klammer): 3,1 (6^{h}), 11,6 (5^{h}), 13,4 (3^{h}). Das galt auch für Tiere, die 24 h gehungert hatten: 0,7 (5^{h}), 2,4 (3^{h}). Analoge Beobachtungen, die während der eingangs geschilderten Leberschnittversuche gemacht wurden, waren der Ausgangspunkt eingehender Untersuchungen über den Acetateinbau in Cholesterol in Abhängigkeit von der Tageszeit. Es stellte sich heraus, daß die Geschwindigkeit der Cholesterolsynthese einen circadianen Rhythmus besitzt; nachts ist die Synthesegeschwindigkeit am höchsten, mittags am niedrigsten (37). Solche tageszeitliche Schwankungen wurden an einer Vielzahl physiologischer Variablen (145) und auch an einer Reihe von Leberenzymen (146, 147) nachgewiesen. Bereits Nakamura (46) hatte an Leberschnitten gezeigt, daß Ratten, die kein Licht empfangen, Acetat schneller in Cholesterol einbauen als Vergleichstiere, die Licht wahrnehmen, und daß der Einbau von MVA in Cholesterol dieser Regulation nicht unterliegt. Damit hatte er den Ort der Regulation auf die vor MVA liegenden Cholesterolvorläufer eingeengt.

In diesem Lichte besehen, rechtfertigen obige spärliche Beobachtungen an der Reduktase die Vermutung, daß dieses Enzym auch der Ort der Regulation des circadianen Rhythmus der Cholesterolsynthese sei; welche Hypothese leicht zu prüfen wäre.

5. Beständigkeit der microsomalen HMG-CoA-Reduktase

Aus verschiedenen Gründen war von einer Versuchsreihe zur anderen der Zeitraum zwischen Schlachten der Tiere und Start der Reduktase-Tests verschieden lang ausgefallen. Es war deshalb wünschenswert zu erfahren, wie die Aktivität der Microsomen sich mit der Zeit ändert. Drei verschiedene Microsomenpräparate wurden mit Phosphatpuffern vom pH 6.5; 7.0; 7.5 hergestellt und je zur Hälfte bei 0^{0}C und 25^{0}C inkubiert. Die Inkubationen begannen (t=0) alle gleichzeitig 6 h nach dem Schlachten der Tiere. Zu verschiedenen Zeiten entnommene Proben wurden auf Reduktase-Aktivität (pH des Standardtestes 7.2) untersucht. Die zeitlichen Aktivitätsänderungen bei 0^{0}C stellt Abb. 56a, bei 25^{0}C Abb. 56b dar. Bei allen pH-Werten und Temperaturen nimmt die Aktivität in einer ersten Phase überraschenderweise zunächst zu, um dann wieder abzufallen. Die Aktivitäten der Proben liegen zu allen Zeiten in der Regel umso höher,

je größer der pH-Wert in der Vorinkubationsperiode war. Lediglich der 8- und der 24-h-Wert für pH 7.5,(25°C) bilden eine Ausnahme. Die Anstiegsphase ist bei pH 7.5 (0°C) und bei pH 6.5 (25°C) bereits nach 1 h, bei pH 7.0 und 7.5 (25°C) nach 2 h beendet. Die pH 6.5- und 7.0-Proben bei 0°C benötigen immerhin 4 h bis sie maximale Aktivität erlangt haben. Der nun Oberhand gewinnende Aktivitätsschwund ist bei 25° wesentlich rascher als bei 0°. Die nach 24 h erreichten Endwerte sind bei 25°C stets niedriger als die Ausgangswerte und bei 0° letzteren vergleichbar. In den Proben von pH 6.5 waren nach 24 h die Microsomen ausgefallen, bei 25°C quantitativ, bei 0°C weniger stark.

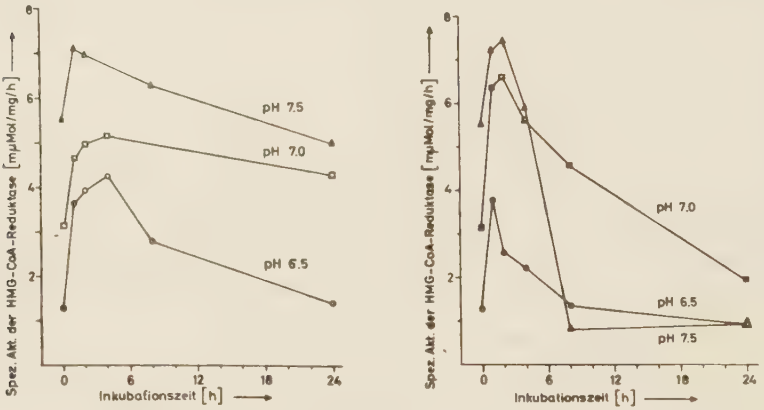


Abbildung 56

Abhängigkeit der Reduktase-Aktivität von der Inkubationszeit bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen. a) 0°C; b) 25°C.

Vor der Probennahme wurde deshalb erneut homogenisiert. Es ist unbekannt, worauf die Aktivitätszunahme zurückzuführen ist. Möglicherweise werden in dieser Phase aktivitätshemmende Stoffe (Enzyme, Protein, Lipide) durch Abbau oder Denaturierung zerstört. So könnte etwa rasche Desaktivierung der HMG-CoA-Lyase ein Grund für die beobachtete Aktivitätssteigerung sein.

6. Versuch zur Ablösung der Reduktase von den Microsomen

Linn (119) berichtete über die Ablösung der HMG-CoA-Reduktase von den Lebermicrosomen. Da dieser Schritt der erste ist auf dem Wege zu einem gereinigten Enzym und ein gereinigtes Enzym eine Reihe von Untersuchungsmöglichkeiten eröffnet, die das

microsomengebundene nicht gestattet, wurde der Linnsche Versuch wiederholt. Linn stellt bei tiefen Temperaturen ein Acetonpulver aus Microsomen her, eluiert es anschließend mit Puffer und zentrifugiert bei 105 000 g 90 min. Dann soll sich die Reduktase-Aktivität im Überstand befinden. Nachfolgende Tab. 16 gibt eine Übersicht über den Versuchsverlauf. Um besonders hohe Ausgangsaktivität zu erhalten, wurden die Tiere nachts gegen 1.30 Uhr geschlachtet (Exptl. Einzelheiten S. 142). Man sieht (Spalte 9), daß bereits vor der Zentrifugation der Acetonpulversuspension nahezu die gesamte Aktivität verloren gegangen und auch die spezifische Aktivität (Spalte 5) um den Faktor 100 zurückgegangen war. Linn hingegen findet Aktivitätsausbeuten von mindestens 100% und auf das zehnfache gesteigerte spezifische Aktivitäten im 105000 g-Überstand. Warum die Linnsche Arbeit nicht reproduziert werden konnte, ist nicht bekannt.

Tabelle 16

Wiederholung des Ablöseversuches von Linn (119)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe Nr.	Enzympräparat Stadium	Protein-konz. mg/ml	Proteinkonz. im Reduktase-test mg/ml	Spezifische Aktivität d. Reduktase mµMol/mg/h	Volumen des Präparates ml	Gesamt protein mg	Gesamt aktivität mµMol/h	Aktivitäts-ausbeute % von Probe 1
1	Microsomen-suspension	19,3	0,96	41,0	23,0	444	18,2	100
2	"		1,93	26,6			-	-
3	Acetonpulver-suspension	4,9	1,18	1,6	12,5	61	0,10	0,55
4	"		2,34	1,3			-	-
5	105 000 g-Überstand	2,5	0,31	0,0	12,5	31	-	-
6	"		0,61	0,5			0,016	0,09
7	"		0,92	0,5			-	-
8	"		1,21	0,4			-	-

VI. Wirkung von Gallensäuren auf die HMG-CoA-Reduktase

Eingangs (S.2,4,5) wurde über eine Reihe von Versuchen berichtet, die darauf hindeuten, daß die Gallensäuren eine regulierende Funktion im Cholesterolstoffwechsel ausüben. Um Informationen über deren Wirkungsweise zu sammeln (bislang war fast nichts darüber bekannt), wurden die folgenden Untersuchungen angestellt.

1. Hemmende Wirkung von Gallensäuren verschiedener Konzentration

Zunächst wurde die Abhängigkeit der microsomalen HMG-CoA-Reduktase-Aktivität von der Konzentration verschiedener freier und konjugierter Gallensäuren, die von Rattenleber synthetisiert werden, untersucht (exptl. Einzelheiten S.146). In Abb. 57 ist über dem Logarithmus der Gallensäurekonzentrationen die prozentuale Hemmung der Reduktase aufgetragen. Unterhalb 10^{-4} M findet man keine bedeutenden Hemmeffekte.

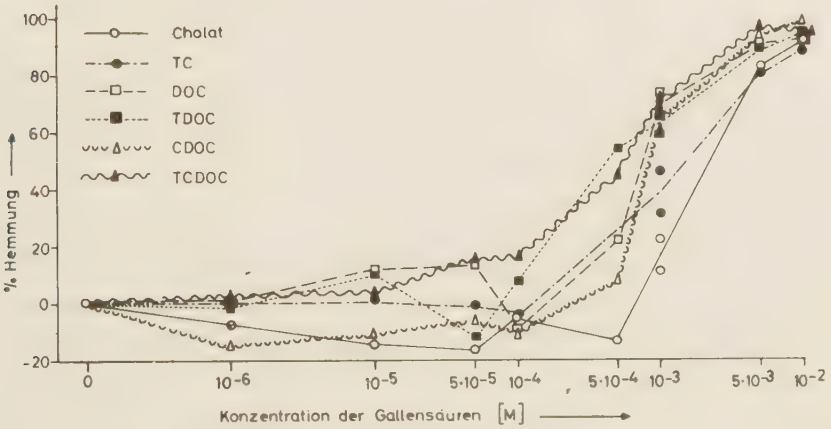


Abbildung 57

Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch verschiedene Gallensäuren

Cholat hemmt selbst bei 10^{-3} M erst zu etwa 15%. Es fällt auf, daß die Taurinkonjugate stets stärker inhibieren als die freien Säuren. Auch hier ist es die tauringebundene Cholsäure, die die geringste Hemmung verursacht. In der Rattenleber liegen 95-99% der Gallensäuren an Taurin gebunden vor (148). Ähnliche Ergebnisse für Cholat, DOC,

TC, TDOC hatte Fimognari (54) für den Einbau von Acetat in MVA an 5000 g-Überständen von Rattenleber-Homogenaten erhalten.

Da alle drei Gallensäuren gleichzeitig in der Leber vorkommen, war zu prüfen, ob sich ihre Effekte addieren. Aus Tab. 17 ist zunächst zu ersehen, daß die Gruppe der freien Gallensäuren schwächer hemmt als die der konjugierten. Das war bereits Abb. 57 zu entnehmen. Drei verschiedene Gallensäuren, gleichzeitig in einer Konzentration von jeweils $1 \cdot 10^{-4}$ M zugegen, hemmen etwas stärker, als für die stärksthemmende Gallensäure der Gruppe in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-4}$ M nach Abb. 57 zu erwarten gewesen wäre.

Tabelle 17

Hemmung der Reduktase durch verschiedene gleichzeitig anwesende Gallensäuren niedriger Konzentration

Gallensäuren	Spezif.Aktivität mµMol/mg/h	Hemmung %
keine	2,4	0
Cholat + DOC + CDOC je 10^{-4} M	1,8	25
TC + TDOC + TCDOC je 10^{-4} M	1,0	58

Jedoch deutet der Versuch an, daß die verschiedenen Spezies prinzipiell in gleicher Weise wirken und sich gleichzeitig vertreten können. Denn in einer Konzentration von 10^{-4} M ruft noch keine eine bedeutende Hemmung hervor, jeweils drei der Gallensäuren dieser Konzentration in gemeinsamer Lösung aber wohl.

Beim Reduktasetest (S. 131) wurde stets Serumalbumin zugesetzt. Der Verdacht bestand, Serumalbumin könne die aktuellen Gallensäurekonzentrationen bei den Versuchen der Abb. 57 (S. 95) stark gesenkt haben, weil es möglicherweise hohe Bindungskapazität für Hydroxycholanate besitze. Von langkettigen Fettsäuren ist eine feste Bindung an Albumin seit langem (149) bekannt. Dieser Einfluß sollte am empfindlichsten spürbar werden in einem Konzentrationsbereich, in welchem Gallensäuren erst eine schwache Hemmwirkung besitzen. Serumalbumin ist nicht nur ohne Einfluß auf die Reduktase-Aktivität, wenn keine Gallensäuren zugegeben wurden, sondern – das ist Tab. 18 zu entnehmen – auch in deren Gegenwart.

Tabelle 18

Untersuchung des Einflusses von Serumalbumin auf die Hemmung der Reduktase durch Gallensäuren

Gallensäure	Konzentration M	Albumin 0,5 mg/ml	Spezif.Aktivität mμMol/mg/h
-	-	+	2,4
-	-	-	2,3
Cholat	10^{-3}	+	1,7
Cholat	10^{-3}	-	1,8
TC	10^{-4}	+	2,4
TC	10^{-4}	-	2,1
TCDOC	10^{-4}	+	2,0
TCDOC	10^{-4}	-	1,8

2. Untersuchung über die Art der Gallensäurehemmung

Um herauszufinden, ob die Hemmung der Reduktase durch Gallensäure kompetitiv oder nichtkompetitiv ist bezüglich HMG-CoA, wurde die Aktivität der Reduktase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in An- und Abwesenheit von TCDOC aufgenommen. Abb. 58 demonstriert, daß selbst hohe HMG-CoA-Konzentrationen die Hemmung durch TCDOC nicht rückgängig machen können, daß also die maximal erreichbare Geschwindigkeit der Reduktionsreaktion durch den Zusatz des Hemmstoffes verändert wird.

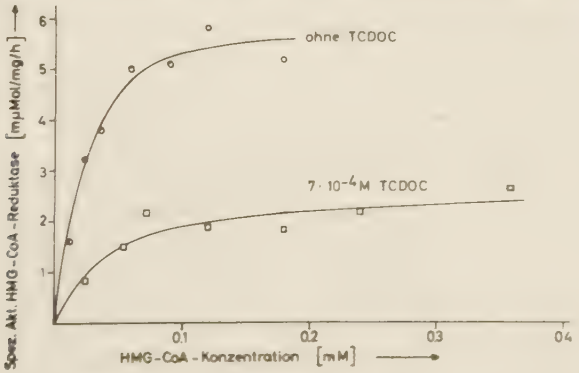


Abbildung 58

Abhängigkeit der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität von der Substratkonzentration in Abwesenheit und Gegenwart von TCDOC.

Dies deutet bereits auf nichtkompetitive Hemmung hin. Werden die experimentellen Daten nach Lineweaver und Burk (138) ausgewertet (Abb. 59), so findet man die Bestätigung: Die Gallensäure verändert die Maximalgeschwindigkeit $V_{max.}$, nicht aber die Michaeliskonstante K_M für HMG-CoA. Denn für erstere erhält man 8,2 (ohne TCDOC) bzw. 2,9 (mit TCDOC) mµMol/mg/h , für K_M $4,7 \cdot 10^{-5}$ M (ohne TCDOC) bzw. $5,7 \cdot 10^{-5}$ M (mit TCDOC). Diese Ergebnisse wurden auch mit Hilfe der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung ausgewertet (150). Hierbei wird der Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit infolge nachlassender Substratsättigung mit zunehmendem Substratverbrauch während der Inkubation Rechnung getragen.

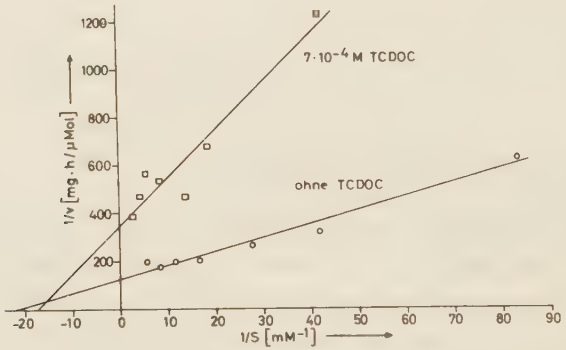


Abbildung 59

Auswertung der Meßdaten von Abb. 58 nach Lineweaver und Burk

Die Geraden wurden als optimale Geraden nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate berechnet.

Nicht berücksichtigt wird jedoch der Verbrauch desselben Substrates durch andere Enzyme (HMG-CoA-Lyase, HMG-CoA-Hydrolase (?)). In Tabelle 19 werden die solcherart erhaltenen Werte denen gegenübergestellt, die aus der Lineweaver-Burk-Darstellung zu entnehmen waren. Während mit beiden Auswerteverfahren gut übereinstimmende $V_{max.}$-Werte gewonnen wurden, und auch für den Versuch mit TCDOC nach beiden Methoden gleiche K_M-Werte errechnet werden, unterscheiden sich die K_M-Werte für den Versuch ohne TCDOC stärker. Zieht man aber die unruhige Lage der Punkte um die Kurven in Abb. 58 und 59 in Betracht, so wird man diese Unterschiede nicht als bedeutend ansehen. In den Untersuchungen von Regen et al. (61) war ein K_M-Wert von $3,3 \cdot 10^{-5}$ M gefunden worden. Es besteht also gute Übereinstimmung zwischen den hier vorgelegten und den früheren Messungen.

Tabelle 19

Vergleich der Michaeliskonstanten und Maximalgeschwindigkeiten, die nach verschiedenen Auswerteverfahren erhalten wurden. LB: Auswertung nach Lineweaver und Burk. Integr. MM: Auswertung mit Hilfe der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung.

Zusatz	$10^5 \cdot K_M$ M		Vmax. mµMol/mg/h	
	LB	Integr. MM	LB	Integr. MM
keiner	4,7	2,9	8,2	7,5
$7 \cdot 10^{-4}$ M TCDOC	5,7	5,7	2,9	2,7

3. Zur Reversibilität der Gallensäurehemmung

Um die Bedeutung der Hemmung der Reduktase durch Gallensäuren für die Regulation der Cholesterolsynthese abschätzen zu können, erschien es wichtig zu wissen, ob die Hemmung rückgängig zu machen ist. In einem ersten Versuch wurden Microsomensuspensionen, denen TC bzw. TCDOC in Konzentrationen von 1 und $3 \cdot 10^{-3}$ M zugesetzt worden waren, zugleich mit der ursprünglichen Microsomensuspension und Microsomen aus Fastenratten gegen Homogenisationsmedium dialysiert. Vor der Dialyse und nach 1- und 2stündiger Dialyse wurden Aktivitätsbestimmungen durchgeführt. In keinem Fall bewirkte die Dialyse eine Reaktivierung.

Wiederholte Suspension und Zentrifugation der Microsomen sollte einen rascheren Stoffaustausch bewirken. Ein derartiger Waschversuch verlief im einzelnen wie folgt: Die aus dem 10^4-g-Überstand durch Zentrifugation bei 10^5 g niedergeschlagenen Microsomen wurden in Homogenisationsmedium suspendiert. Ein Teil der Suspension normaler Microsomen wurde sodann auf eine TCDOC-Konzentration von 10^{-3} M gebracht. Dieses Präparat, das gallensäurefreie Präparat und die entsprechende Microsomensuspension aus Fastentieren befanden sich definitionsgemäß im Stadium 0 (Tab. 20). Ihr Proteingehalt und ihre Reduktase-Aktivität wurden bestimmt. Sodann wurden die Microsomen aller 3 Präparate erneut bei 10^5 g sedimentiert und wiederum in Homogenisationsmedium suspendiert. Die entstandenen Suspensionen (Stadium 1, Tab. 20) wurden auf Proteingehalt und Reduktase-Aktivität untersucht. Nach erneuter Zentrifugation bei 10^5 g und Resuspension befanden sich die Microsomenpräparate im Stadium 2 und abermals wurden Proteinkonzentration und Aktivität gemessen.

Tabelle 20

Waschversuche an Microsomen zur Aktivierung der Reduktase nach Gallensäurehemmung und Fasten

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Microsomen	Stadium[1]	Microsomenprotein mg	% [2]	Aktivität mμMol/h	% [2]	Spezif. Aktivität mμMol/mg/h	% [2]	Hemmung % [3]
normal	0	134	100	1820	100	13,6	100	0
	1	90	68	2190	120	24,2	178	0
	2	64	48	1530	84	24,0	177	0
normal + TCDOC 10^{-3} M	0	154	100	1390	100	9,0	100	34
	1	62	40	1280	93	20,7	230	49
	2	43	28	830	60	19,2	214	53
Fasten	0	103	100	250	100	2,4	100	82
	1	87	85	220	88	2,5	104	87
	2	63	61	160	64	2,5	104	87

[1] Stadium 0 : vor der 1. Waschung; 1: nach der 1. Waschung; 2: nach der 2. Waschung

[2] Die prozentualen Angaben für Microsomenprotein, Aktivität und spezifische Aktivität wurden durch Beziehung der Werte für Stadium 1 und 2 auf den für Stadium 0 gewonnen.

[3] Die prozentuale Hemmung wurde wie folgt berechnet: Die Aktivitätswerte (Spalte 5) für "normal + TCDOC" und "Fasten" wurden auf für alle 3 Versuchsgruppen einheitliche Ausgangsproteinmengen (Stadium 0), z.B. 134 mg, umgerechnet. Die so erhaltenen Aktivitätswerte jedes Stadiums (0,1,2) für "normal + TCDOC" und "Fasten" wurden auf den Wert des entsprechenden Stadiums (0,1 oder 2) für "normal"(= 100% Aktivität) bezogen. Die Differenz zu 100% ist die Hemmung in %.

Wie die Spalten 3 und 4, Tab. 20, zeigen, geht beim Waschen eine große Menge des microsomalen Proteins in Lösung, insgesamt etwa die Hälfte bei normalen Microsomen und Microsomen aus Hungerratten, über $^2/_3$ bei dem mit dem Detergens TCDOC versetzten Präparat. Da bei der 1. Waschung die Aktivitäten nicht so stark abnehmen wie der Proteingehalt (Spalten 5 und 6), steigen die spezifischen Aktivitäten (Spalten 7 und 8) – außer bei den Fastenmicrosomen – stark an; sie können keinen Aufschluß darüber schaffen, ob der Waschvorgang eine Reaktivierung zur Folge hatte. Erst der eingehende Vergleich der Aktivitätswerte (Spalte 5) mit den entsprechenden Kontrollwerten gibt in Form der prozentualen Hemmung (Spalte 9) durch TCDOC bzw. Fasten auf jeder der Waschstufen ein Maß, das die Vorgänge besser interpretieren läßt. Spalte 9 verdeutlicht, daß wahrscheinlich keine Reaktivierung stattfindet, weder bei den Microsomen aus Hungerratten noch bei den TCDOC-behandelten. Vielmehr nimmt bei letzteren die Hemmung sogar noch zu, oder genauer: Die microsomale Aktivität der mit TCDOC versetzten Proben sinkt beim Waschen rascher ab als die der Kontrollproben. Dieser Aktivitätsschwund wurde jedoch nur für die Microsomen gemessen. Es war mit dem verwendeten Test nicht möglich – ohne Verwendung einer sehr ungenauen Differenzmethode – festzustellen, ob beim Waschen gleichzeitig mit den großen Proteinmengen auch HMG-CoA-Reduktase-Aktivität von den Microsomen in den stets klaren 105000 g-Überstand überging.

Nur wenn man eine Solubilisierung aktiver Reduktase ausschließt, kann man feststellen, daß keine Reaktivierung der TCDOC-Microsomen und Microsomen aus Fastentieren stattfand. Vorausgesetzt wird aber auch dann noch, daß man die normalen Microsomen als Modell für die mit Gallensäure inkubierten normalen Microsomen ansehen kann; d.h., daß die während der Waschvorgänge auftretenden Aktivitätsänderungen des Kontrollpräparates (normale Microsomen) in gleicher Richtung und gleichem Maße bei beiden anderen Proben (normale Microsomen + TCDOC und Microsomen aus Fastentieren) stattfinden. Die gefundenen Aktivitätswerte dieser Proben wären dann das Resultat der Überlagerung zweier Vorgänge, nämlich: 1. der Aktivitätsänderungen, die auch bei der Kontrollprobe stattfinden und 2. spezieller, nur diesen Proben eigener Aktivitätsänderungen. Die Verschiebung der Werte in Spalte 9 mit dem Versuchsstadium würde dann nur letztere spezielle Änderungen wiederspiegeln.

Es sei bemerkt, daß die erste Waschung eine Anreicherung der microsomalen Reduktase um ungefähr den Faktor 2 bewirkt (Spalte 8). Möglicherweise ließe sich durch geringere Gallensäurekonzentrationen, die noch keine bedeutende Hemmung verursachen,

oder durch Verwendung des nur schwach inhibierenden Cholats die Anreicherung noch steigern. Und schließlich wäre zu untersuchen, ob die HMG-CoA-Lyase auf solche Weise von den Microsomen heruntergewaschen und damit ein wesentlicher Störfaktor der Reduktasetests ausgeschaltet werden könnte.

VII. Zusammenfassende Diskussion

Die Triebfeder vorliegender Untersuchungen war der Wunsch zu erfahren, auf welche Weise die Cholesterolsynthese in der Leber reguliert wird. In der Einleitung wurde eine beträchtliche Zahl physiologischer Größen vorgestellt, die die Cholesterolsynthese beeinflussen. Von diesen wurde zur näheren Untersuchung der Ernährungszustand ausgewählt. Und zwar wurden meistens Zustände verglichen, die sich einstellten, wenn diese Größe Extremwerte annahm: Fastenzustand einerseits und andererseits Ernährung mit einer standardisierten Volldiät. Fast zwangsläufig gesellten sich dann weitere Größen hinzu, die ihren Einfluß auf die Synthese des Cholesterols geltend machen: Alter der Tiere und Tageszeit.

Für den Mechanismus der Regulation durch den Ernährungszustand ließen sich für die beiden Grundprinzipien, Regulation auf der Ebene des Proteinstoffwechsels und Steuerung über Beeinflussung der Enzymmolekeln, jeweils eine Reihe von Varianten vorsehen. Da die HMG-CoA-Reduktase als das Enzym erkannt worden war, dessen Aktivität die Geschwindigkeit der Cholesterolsynthese aus Acetat oder HMG-CoA angibt (41), wurde statt des gesamten synthetisierenden Systems zum größten Teil nur dieses Enzym untersucht.

Auf der Ebene des Enzyms hätte das Fehlen eines Aktivators der Reduktase die Synthese unterbrochen. Die gleiche Wirkung hätte die Gegenwart eines Hemmstoffes oder der Mangel an Substrat oder Cosubstrat hervorgerufen. Nachdem bereits früher (151,152) gezeigt worden war, daß Hunger die Acetacetatbildung in der Leber beschleunigt und daß die Microsomen aus Fastentieren HMG-CoA nicht umsetzen (41), konnte ein Versuch gleichen Ergebnisses selbst bei hoher HMG-CoA-Konzentration (S. 84) nur noch Bestätigung sein: Substratmangel ist nicht der Grund verminderter Cholesterolsynthese.

Obwohl eine Fülle von Befunden (Kapitel I) die Gallensäuren als mögliche Feedback-Inhibitoren in den Vordergrund rückten, dürften sie – nach den hier vorgelegten Untersuchungen – diese Funktion auf dem Enzymniveau nicht erfüllen, welche Feststellung derjenigen Fimognaris und Rodwells (54,55) widerspricht. Weder konkurrieren sie mit HMG-CoA um denselben Platz am Enzym, noch ist es wahrscheinlich, daß die von ihnen verursachte Hemmung durch Waschen rückgängig zu machen ist. Was aber bedeutet, daß die Gallensäuren nicht die Funktion eines Effektors an einem allosterischen

Enzym ausüben. Dabei gelingt es durchaus, mit $2 \cdot 10^{-3}$ M DOC gehemmte NADase durch Verdünnen der Lösung vollständig zu reaktivieren (153). Ferner ist wohlbekannt, daß eine Reihe von Enzymen durch Gallensäuren ebenso desaktiviert werden wie durch manche andere Detergentien. So unternahmen Miller und Gaylor (154) Hemmversuche mit diversen freien und konjugierten Gallensäuren am Lanosterol demethylierenden Enzymsystem der Rattenleber. Da die Steroidhormone in den sie erzeugenden Geweben ihre eigene Synthese aus Lanosterol auf dieser Stufe hemmen, prüften die Autoren das analoge System Gallensäuren/Lanosterol der Leber. Sie fanden nennenswerte Hemmungen erst oberhalb 10^{-3} M Gallensäuren und halten diese Effekte für unspezifische Detergenswirkungen auf die Microsomen, wie sie etwa von Hess und Lagg (155) beobachtet wurden. Back (37) bestimmte die Konzentrationen der Gallensäuren in Leber von normal ernährten und von Hungerratten und fand praktisch keinen Unterschied. Die Gesamtmenge der angetroffenen Gallensäuren würde eine ca. $5 \cdot 10^{-4}$ M Lösung ergeben, wenn sie das ganze Lebervolumen zur Verfügung hätte. Sieht man von starker Kompartmentierung ab, so verdeutlicht ein Blick auf Abb. 57, S. 95, daß Hemmung durch Gallensäuren dieser Konzentration nicht die Ursache für das Verschwinden der Reduktaseaktivität in der Leber von Hungerratten sein kann.

Fütterung mit Gallensäuren in der Nahrung (siehe Kapitel I) hatte zwar die Cholesterolsynthese in der Leber weitgehend zum Stillstand gebracht und umgekehrt verlieh Zusatz von Anionenaustauschern, die Hydroxycholanate binden, der Nahrung aktivierende Eigenschaften (S. 32). Doch sagen diese Ergebnisse über den Mechanismus, nach dem diese Effekte zustande kommen, genauso wenig aus wie der Gallenfistelversuch von Myant und Eder (S. 31). Bisher ist – abgesehen von den Experimenten Fimognaris und den vorliegenden – nie versucht worden, einen direkten Einfluß der Gallensäuren auf einen Schritt des Cholesterolaufbaus nachzuweisen. Da es außer Zweifel steht, daß die Gallensäuren die Cholesterolentstehung in vivo beeinflussen, sie aber – das wurde hier dargelegt – nicht als kompetitive oder allosterische Inhibitoren auf dem Enzymniveau der HMG-CoA-Reduktase fungieren, muß man andere Wirkungsmöglichkeiten näher betrachten.

Zunächst soll aber noch der Fall erwogen werden, daß der Reduktase aus Fastenlebern ein Aktivator mangelt. Man müßte dann annehmen, daß wohlernährte Tiere ihn besitzen. Wäre er wasserlöslich, dann müßte er beim Aufschluß der Leber bereits zu beträchtlichem Teil verloren gehen (für einen hydrophilen Inhibitor würden natürlich analoge

Überlegungen anzustellen sein); wenn er außerdem noch kochstabil wäre, sollte die gekochte lösliche Fraktion Microsomen aus Fastenratten oder wenig aktive Reduktasepräparate aktivieren. Dies ist nicht der Fall (Tab. 15, S. 89). Schließlich hätte wiederholtes Waschen aktiver Microsomen deren starke Desaktivierung zur Folge haben müssen - was ebenfalls nicht beobachtet wurde (Tab. 20, S. 100). Wäre der Aktivator hingegen lipophil, so hätte er mit organischen Lösungsmitteln aus aktiven Microsomen extrahiert und Microsomen aus Fastenratten zugesetzt, diesen wahrscheinlich Aktivität verleihen müssen; aber auch das wurde nicht festgestellt (Tab. 12, S. 87).

Nachdem auch für die Aktivatorhypothese keine experimentelle Stütze erhalten werden konnte, sollte noch geprüft werden, ob im Fastenzustand verstärkte Permeabilitätsschranken der Microsomenmembran das Substrat vom Enzym fernhalten. Man müßte sich dann die Reduktase als im Innern des Microsomenbläschens befindlich vorstellen. Auflösung der Membran inaktiver Microsomen sollte dann eine Aktivierung bewirken, wenn aktive Microsomen durch den Solubilisierungsprozeß nicht gehemmt werden. Daß letzteres zwar zutrifft, aber trotzdem Microsomen aus Hungerratten keine Aktivitätssteigerung erfahren, lehrt das Ergebnis der Tritonversuche (Tab. 10, S. 85). In der Literatur wird beschrieben (156,157), daß Tritonlösungen von 0,5-1,5 Gew.% Membranen auflösen. Außerdem ist dieser Vorgang nach Zusatz des Detergens deutlich an der Abnahme der Trübung einer Microsomensuspension festzustellen. Nachdem keine Hinweise für eine Regulation an der Enzymmolekel beigebracht werden konnten, wollen wir untersuchen, ob welche für eine Steuerung durch Synthese und Abbau der Reduktasemolekel vorliegen. Leberproteine werden relativ rasch umgesetzt (158), rascher einige Leberenzyme wie Tyrosin-α-Ketoglutarat-Transaminase (Halblebenszeit 4 h) (159), Arginase (4-5 h) (160) und Tryptophanpyrrolase (2,4 h) (161). Omura, Siekewitz und Palade (162) bestimmten kürzlich den Umsatz von Bestandteilen des endoplasmatischen Reticulums der Rattenleber. Sie fanden für das Gesamtprotein, Phospholipidacylreste, Cytochrom b 5 und TPNH-Cytochrom-c-Reduktase Halblebenszeiten zwischen 3 und 5 Tagen, also etwa von der Größe, die man für Gesamtleberproteine ermittelt hatte. Für den Glycerinanteil der Phospholipide dieser Membranen geben sie aber nur 29 h Halblebenszeit an. Es sieht also so aus, als ob auch die Vorläufer der Lebermicrosomen einem dynamischen Gleichgewicht zwischen raschem Auf- und Abbau unterworfen sind wie die gesamte Leberzelle. Dann ist es aber nicht unwahrscheinlich, daß es auch besonders kurzlebige Enzyme gibt, die Bestandteil des endoplasmatischen Reticulums sind. Nun

sinkt die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität innerhalb von 5 h Fastenzeit auf etwa ein Drittel der Ausgangsaktivität (61). Nimmt man an, daß während der Fastenperiode der Enzymaufbau unterbrochen ist, der Abbau aber unverändert weiter geht, dann wird aus den Fastenversuchen (61) eine Halblebenszeit von ca. 3 h ermittelt. Die Wiederfütterungsversuche mit kommerzieller Volldiät (Abb. 15, S. 24) ließen demgegenüber aber einen beträchtlich langsameren Anstieg erkennen. Bei nach wie vor unveränderter Abbaugeschwindigkeit muß der Anstieg gemächlicher verlaufen als der Abfall, da seine Geschwindigkeit die Differenz der Synthese- und der Abbaugeschwindigkeit darstellt. In dieses Bild paßt ferner, daß nur Verfütterung proteinhaltiger Diäten an Fastentiere einen Wiederanstieg der Reduktase-Aktivität nach sich zieht, wobei aber in der Regel große quantitative Unterschiede zwischen kommerzieller und semisynthethischer Diät auffallen. An anderer Stelle (S. 31) wurden bereits die Arbeiten besprochen, aus denen hervorging, daß sowohl Gallensäuren als auch Cholesterolausscheidung bei Verabreichung stark rohfaserhaltiger Nahrung (kommerzielle Diät) erhöht sind. Da die Gallensäuren zur Resorption des Cholesterols unbedingt notwendig sind (81), dürfte der Cholesterolverlust eine Folge der erhöhten anderweitigen Bindung der Gallensäuren sein. Man könnte sich also auch vorstellen, daß sämtliche in vivo beobachtete Gallensäureeffekte in Wirklichkeit Cholesteroleffekte sind, weil Cholesterolresorption im Dünndarm von der effektiven Gallensäurekonzentration abhängt. Gallensäuren sind insbesondere notwendig für die Veresterung freien Cholesterols im Dünndarmlumen und der Dünndarmmucosa (163,164), Veresterung aber ist entscheidend für die Resorption des Cholesterols. Man müßte – wenn obige Hypothese richtig ist – wahrscheinlich durch Verfütterung eines kompetitiven Inhibitors der Cholesterolveresterung, z.B. 2-Äthylcapronat (163), die Cholesterolsynthesegeschwindigkeit in der Leber steigern können, ohne die Gallensäureresorption wesentlich zu beeinflussen. Die Cholesterolresorption im Intestinum ließe sich dabei leicht mit radioaktivem Cholesterol verfolgen. Eine andere Möglichkeit, Cholesterol und Gallensäureeffekte zu trennen, wäre die Verfütterung einer semisynthetischen Diät, die Ionenaustauscher enthalten müßte (siehe S. 32) und gleichzeitiger Ersatz der ausgeschiedenen Gallensäuren durch Infusion in die Pfortader. Nach obiger Hypothese wäre erneut Erhöhung der hepatischen Cholesterolsynthese zu erwarten. Solche Entfernung von Cholesterol aus dem Organismus ohne Beeinflussung der Gallensäuren-Exkretion gelang Swell et al. (40) an Lymphfistelratten. Das Ergebnis war auch diesmal Vervielfachung der Synthesegeschwindig-

keit des eliminierten Stoffes in der Leber. Den umgekehrten Effekt erreicht man durch Verfütterung von Cholesterol in der Nahrung (siehe S. 2). Da der faekale Cholesterolverlust dann am größten ist, wenn die Nahrung den Darm passiert, müßte man die höchste Cholesterol-Bildungsgeschwindigkeit beobachten, wenn die Tiere fressen. Das tun sie am intensivsten bei Dunkelheit. Und in der Tat wurden nachts höhere Reduktase-Aktivitäten nachgewiesen als am Tage. Der Fastenzustand der Ratten wäre dann dem Zustand der Tiere bei Helligkeit vergleichbar. Und hier wird auch deutlich, wie fragwürdig es bei Ad-libitum-Fütterung ist, etwa von einer Fastenperiode von wenigen Stunden zu sprechen, wenn dieser Zeitabschnitt in die Helligkeitsphase fällt. Auf welche Weise der Wechsel zwischen Hell und Dunkel die Freßaktivität beeinflußt, kann nur vermutet werden. Vielleicht spielen Hormone hier eine Rolle. Anstelle der Kausalkette 1. Helligkeit - 2. Hormone - 3. Freßaktivität - 4. Cholesterolausscheidung - 5. HMG-CoA-Reduktase-Konzentration - 6. Cholesterolsynthese ließe sich aber auch ein direkter hormoneller Effekt ohne Zwischenschaltung der Stufen 3. und 4. formulieren. Man hätte es dann mit zwei parallelen Vorgängen der gleichen Ursache zu tun, zwischen denen keine kausale Verknüpfung bestünde. Hierüber müßten Experimente entscheiden.

Wenn aber der Ernährungszustand seinen Einfluß auf die Cholesterolsynthese über die Regulation der Reduktase-Konzentration in der Leber ausüben würde, wäre zunächst zu klären, ob bevorzugt über Auf- oder Abbau der Enzymmolekel reguliert wird. Würde in erster Linie der Abbau betroffen, dann würde der Fasteneffekt in beschleunigtem Enzymabbau bei konstanter Neubildung bestehen. Der Grund hierfür wäre dann z.B. darin zu suchen, daß das Substrat HMG-CoA, welches das Enzym normalerweise vor dem Angriff der Proteinasen schützte, im Fastenzustand fehlte. Gegen den Substratmangel spricht die hohe Acetacetatbildung in der Leber.

Würde über die Enzymsynthese reguliert, so müßte der Fasteneffekt verminderte De-novo-Synthese bei konstantem Abbau wiederspiegeln. Die Ursache könnte man z.B. im Mangel an Aminosäuren vermuten. Dagegen spricht, daß manche Enzyme wie etwa Xanthindehydrogenase (165) gerade im Hungerzustand induziert werden, und daß Wiederfütterung mit semisynthetischer Proteindiät der mit kommerzieller Diät weit unterlegen ist. Somit wäre schließlich die Synthese der Botschafter-RNS als Regulationsort zu betrachten. Die RNS-Synthese könnte verhindert werden durch Mangel an Purin- und Pyrimidinbasen oder an Energie. Letzteres ist jedoch unwahrscheinlich, da Wiederfütterung mit Kohlenhydrat- oder Fettdiäten keine Reaktivierung zur Folge hat; über

die Vorräte an Basen müßten Versuche Aufschluß geben. Vor allem aber würde die Menge der Reduktase-Botschafter-RNS sehr niedrig sein, wenn ein Repressor durch einen Effektor befähigt würde, die Transskription zu blockieren (HMG-CoA-Reduktase als anabolisches Enzym). Als Effektor könnte man – in Analogie zu den Enzymsystemen der Bakterien – am ehesten das Endprodukt der Synthesekette, Cholesterol, vermuten. Dieses ist aber sowohl in Lebern normal ernährter als auch gefasteter Tiere in beträchtlicher Konzentration enthalten. Oder man könnte einem seiner Ester solche Funktion zuschreiben. Wobei die Schwierigkeit bestünde, daß das zwischengeschaltete veresternde System möglicherweise limitierend – und damit regulierend – wirken könnte, z.B. bei geringer Aktivität, kleiner Michaeliskonstante oder Mangel an Veresterungspartner.

Das bislang einzige in Säugetieren gefundene wasserlösliche Cholesterolderivat ist das Cholesterolsulfat (166, 167). Mit Hilfe von Doppelmarkierungsexperimenten wurde bewiesen, daß es als Ausgangsmaterial für die Bildung von Steroidhormonen dient (168). Weitere biologische Funktionen sind nicht ausgeschlossen.

Die Tatsache, daß bei familiärer Hypercholesterolämie durch Cholesterolfütterung nicht der bereits bekannte Rückkopplungsmechanismus der Synthese in der Leber ausgelöst wird (169), verdient in diesem Zusammenhang besondere Beachtung. Befunde, daß Cholesterolfütterung den Leucineinbau in Microsomenproteine in vivo verlangsamt (170), könnten ebenso in die angedeutete Richtung (daß der Cholesterolaufbau auf der Ebene der Enzymbiosynthese leicht beeinflußbar ist) weisen wie der Bericht, daß nach Phenobarbital-Injektion der Einbau von Acetat – nicht Mevalonat – in Cholesterol in vivo und in Leberschnitten erhöht und die Menge des endoplasmatischen Reticulums vergrößert wird (171). Denn es existiert eine größere Zahl von Berichten, daß Pharmaca und carcinogene Aromaten nicht nur microsomale Enzyme induzieren, die die oxydative Veränderung jener Stoffe katalysieren (172,173), sondern auch Enzyme, die völlig andere Aufgaben erfüllen (174-176). Selbst Drogen, die keinerlei Veränderung im Organismus erfahren, können solche Induktionen hervorrufen (174). Möglicherweise wirkt auch Triton, das einen Benzolring enthält (Formel S. 112), in dieser recht unspezifischen Weise. Schließlich wirft die Kompartmentierung des Genmaterials wegen der Kern- bzw. Mitochondrienmembran die Frage nach der Art des Transports der Effektoren auf.

Guder (44) berichtet, daß die HMG-CoA-Reduktase der Leber normal ernährter Ratten vorwiegend in den rauhen Membranen angetroffen wird. Dies aber würde man erwarten, wenn die Enzymsynthese an den rauhen Membranen sich abspielte, die glatten Membranen aus den rauhen durch Ablösung der Ribosomen entstünden und das Enzym eine kurze Halblebenszeit besäße. Von einer wahrscheinlich sehr kurzen Halblebenszeit der Reduktase war oben die Rede. Über die mögliche Erfüllung der beiden anderen Bedingungen findet man Angaben in der Literatur: Gleichgültig, ob der Anstieg der Enzymaktivität in der sich entwickelnden Leber neugeborener Ratten beobachtet wird (177), oder jener in Lebern phenobarbital-behandelter (173) Tiere, oder der Einbau von ^{14}C-Leucin in Protein (170), jedesmal erscheint die Aktivität in den rauhen Membranen des endoplasmatischen Reticulums früher als in den glatten.

Wir haben aus den Puromycin-Hemmversuchen (S. 33) einen weiteren – wenn auch keinen starken – Hinweis erhalten, daß die Regulation der Cholesterolsynthese auf dem Enzymniveau stattfindet. In diesem speziellen Fall bestand die Schwierigkeit des Versuches darin, daß puromycin-behandelte Tiere nicht mehr fressen, die kommerzielle Diät aber gerade die höchsten Aktivitäten bringt. Es ließen sich durch weitere Versuche am lebenden Tier sicher noch viele wertvolle Informationen über den Regulationsmechanismus der Cholesterolsynthese gewinnen. Aber um einen strengeren Beweis zu führen, würde zunächst dem Weg zu folgen sein, den Feigelson und Greengard (178,179) sowie Schimke (180) mit ihren Untersuchungen über das adaptive Enzym Tryptophanpyrrolase vorgezeichnet haben: Reinigung des Enzyms und Beobachtung seines Auf- und Abbaus mit radio- und immunochemischen Methoden.

VIII. Experimenteller Teil

1. Geräte

Photometer Eppendorf, Netheler und Hinz, Hamburg, mit und ohne Philips-Kompensograph PR 2210 A/00

Spektralphotometer Zeiss, Modell M4QII

Registrierendes Spektralphotometer, Modell 14, Cary, Monrovia/USA

Kofler-Heizmikroskop, C. Reichert AG, Wien

Präparative Ultrazentrifuge, Beckman Spinco, Modell L, Rotor 40

Automatic Superspeed Centrifuge, Sorvall, Rotor SS34

Christ Tischzentrifuge, Superspeed Junior 1

Homogenisator, E. Bühler, Tübingen

Küchenmaschine Starmix, Fa. Elektrostar

Rasierklingen Rotbart Extradünn

Metabolischer Schüttler, B. Braun, Melsungen

Injektionsspritzen Inaltera Supra, 1, 2, 5 ml

Hamilton Microliterspritzen, 10, 25, 50 µl, G. Schmidt, Hamburg

Hochdruckdampfsterilisator, Küster, Stuttgart

pH-Meter, Modell 12/AMZ, Pusl, München

Präzisionspotentiometer, Modell E 187, Metrohm, Herisau, Schweiz

Fraktionskollektor, Zentralwerkstätten Göttingen

Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 314-DC

$^1/_8$ Zoll Edelstahlrohre, Schoeller-Werke, Hellenthal/Eifel

Folgende Geräte: Gaschromatographen Aerograph 1520 oder 202-1B mit W- bzw. WX-Filamenten im WLD, Varian Aerograph, Darmstadt; Tri-Carb Verbrennungsofen, Modell 325, mit heizbarer Verbindungsleitung, 2 Fuß lang, Tri-Carb Szintillations-Spektrometer Modelle 3101 oder 2001 mit Gasdurchfluß-Szintillationszelle (Volumen ca. 8 ml), Einkanal-Ratemeter Modell 280A, Packard Instrument, Frankfurt/M.; 2 Kompensations-Linienschreiber, Typ 5015, Meßbereich 0-1 mV, Honeywell, Frankfurt/M. waren zu einer Radiogaschromatographie-Einheit zusammengeschaltet.

Rechenanlage ALCOR TR4 (2), Rechenzentrum der Bayerischen Akademie der Wissenschaften, München.

2. Chemikalien, Substrate, Enzyme

Zur Herstellung von Lösungen wurde stets deionisiertes Wasser verwendet. Sofern die Herkunft von Chemikalien nicht eigens angegeben, stammten sie von der Fa. E. Merck, Darmstadt, und besaßen die höchste erhältliche Reinheit. Sämtliche Gase (Carbogen 95% O_2/5% CO_2; N_2; nachgereinigtes He und H_2) wurden von der Fa. Linde, München, bezogen. Kartoffel- und Maisstärke (Bender u. Hobein, München); Mazolaöl und Glucose-monohydrat (Deutsche Maizena, Hamburg); Cocosfett Palmin (Deutsche Margarineunion, Hamburg); Cellulosepulver, TMCS, Thioglycol, KBH_4, Jodacetamid (Th. Schuchardt, München);HMDS, TDSME, MVL (C. Roth, Karlsruhe); Triton WR 1339 (i-Octyl-C_6H_4-O-(CH_2-CH_2-O)$_n$-H), Hyflo Supercel, Dowex-50X2, Amberlite IRA 400 (Serva, Heidelberg); Chenodesoxycholsäure, Dithiothreitol (Calbiochem, Luzern, Schweiz); Naphthalin (Unfried, München); PPO, POPOP (Packard Instrument, Frankfurt/M.); NPGS, Chromosorb W a.w. (Varian Aerograph, Darmstadt); HMGS war von Herrn Dr. D.M. Regen synthetisiert (61) und mir freundlicherweise überlassen worden; [1-^{14}C]-Acetat, spez. Akt. 20-30 mC/mMol, $Ba^{14}CO_3$, spez. Akt. 32,5 mC/mMol, [1-^{14}C]-n-Hexadecan, spez. Akt. 0,781 µC/g (Radiochemical Centre, Amersham, England); Puromycin-dihydrochlorid (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland/Ohio); CoA, DPN, TPN, TPNH, ATP, Tris, Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phospat-Dehydrogenase, Lactatdehydrogenase, D(-)-β-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, Citratsynthase, Glutathion (C.F. Boehringer u. Söhne, Mannheim); Serumalbumin vom Rind (Behring-Werke, Marburg); β-Methylcrotonsäureanhydrid und β-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aus Achromobacter stellte Herr Dr. K. Rehn zur Verfügung; β-Methylglutaconyl-CoA-Hydratase war ein mehrere Jahre altes Präparat (122), das in eingefrorenem Zustand aufbewahrt worden war. HMG-CoA-Lyase aus Rinderleber wurde nach Lynen et al. (181) gereinigt.

3. Ratten und Standarddiät

Sämtliche Ratten waren männliche Sprague-Dawley von der Fa. Wiga, Ottobrunn bei München. Sie wurden gefüttert mit der Standarddiät Altromin R15, bezogen über Fa. J. Stettner, München.

4. Zu Kapitel II (Cholesterolsynthese in der Leber wiedergefütterter Ratten)

a) Tierhaltung und Diäten

Tierhaltung. Die Tiere wurden in Drahtgitterkäfigen mit Bodenrost gehalten, sodaß der Kot nach unten durchfallen konnte. Die Käfige befanden sich auf dem Boden eines von Tageslicht gut erhellten größeren Raumes, der nicht klimatisiert war. Normaltemperatur 22-23°C.

Fütterung. Die Standarddiät wurde auf den Boden der Käfige gestreut. Halbsynthetische pulverförmige Diäten (Tab. 21, S. 114) wurden mit Wasser im Gewichtsverhältnis 10:9 zu einer noch nicht nassen konsistenten Paste angerührt, welche sich an die Wand eines 250-ml-Becherglases pressen ließ ohne herabzugleiten. Diese Futterbehälter wurden mit Draht in einer Ecke des durch ein Trenngitter in 2 Abteile unterteilten Käfigraumes fixiert. Bei den Wiederfütterungsexperimenten (Kapitel II, S. 23-30) erhielten bis zu 5 Tiere ihr Futter in einem gemeinsamen großen Käfig (halbsynthetische Nahrungen in 5 Bechergläsern). Während aller übrigen Versuche in Kapitel II wurden die Tiere einzeln gehalten. Auch bei den in Kapitel II, S.30f beschriebenen Experimenten wurden alle Diäten – einschließlich Altromin – in Pulverform, angerührt mit Wasser im Gewichtsverhältnis 1 : 1, wie oben beschrieben, gereicht. Bei allen übrigen Versuchen wurden die Ratten stets zu mehreren in einem Käfig gehalten.

Sämtliche Diäten sowie Leitungswasser wurden ad libitum gewährt und – außer den Altrominpastillen – einmal täglich erneuert. Bei den Versuchen in Kapitel II wurden die Tiere in der Regel einmal täglich (immer zur selben Zeit) gewogen; bei den übrigen Versuchen wurden die Gewichte in Abständen von mehreren Tagen kontrolliert.

Zusammensetzung und Herstellung der Diäten. Nähere Angaben über Altromin finden sich bei Brock et al. (182). Tab. 21 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten semisynthetischen Diäten (Zahlenangaben in Gew.%). Die pulverförmigen Bestandteile wurden durch Schütteln in einem Behälter gründlich vermischt. Sodann wurde zu einem kleinen Teil der Mischung das Vitaminpräparat pipettiert und das Gemenge nach Homogenisation in einem Mörser gleichmäßig in der Hauptmasse verteilt. Dieser Mischung wurde zur Herstellung der fetthaltigen Diäten Mazolaöl und/oder geschmolzenes Cocosfett, sowie ein Tropfen Tocopherolacetat (dem Fett zugesetzt) beigefügt und das Gemenge homogenisiert.

Tabelle 21

Zusammensetzung einiger semisynthetischer Diäten
(Zahlenangaben in Gew.%)

Ingredienz	Voll-diät	Voll-diät	Kohlenhydrat-diät		Protein-diät		Mazola-diät		Cocosfett-diät	
	A	B	C | D		E | F		G		H	
			Versuch		Versuch		Versuch		Versuch	
			1	2	1	2	1	2	1	2
Stärke	28	28	26,6	60	-	-	-	-	-	-
Glucose · H_2O	30	30	60,4	27	-	-	-	-	-	-
Casein	14	21	-	-	60	87	-	-	-	-
Gelatine	7	-	-	-	27	-	-	-	-	-
Mazolaöl	2,5	2,5	-	-	-	-	39	39	-	-
Cocosfett	2,5	2,5	-	-	-	-	-	-	39	39
Salze	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Cellulose	10	10	7	7	7	7	55	55	55	55

Setzt man den Tieren diese annähernd farblosen Pulver vor, so dauert es mindestens 2 Tage, bis sie davon zu fressen beginnen. Pastenartige semisynthetische Diäten (s.o.) fressen die bis dahin mit Altromin versorgten Tiere manchmal nach weniger als 1 h. Um sicher zu sein, daß Hungerratten die Diäten sofort fressen, erhielten sie diese also in angefeuchtetem Zustand. Zudem wurde ihnen mindestens einen Tag lang vor der Fastenperiode die halbsynthetische Volldiät A oder B angefeuchtet gereicht, um sie an die Form der Nahrung zu gewöhnen. Der Erfolg war, daß alle Fastentiere bei Wiederfütterung innerhalb einer min die jeweils vorgesetzte halbsynthetische Diät zu fressen begannen.

Vitaminmischung. Der Vitaminbedarf von Ratten wurde (73, S. 273) entnommen. 51 mg Vitamin K_3; 100 mg Vitamin B_1-dichlorid; 250 mg Vitamin B_2; 100 mg Vitamin B_6; 1,3 mg Vitamin B_{12}; 500 mg Ca-Pantothenat; 500 mg Nicotinsäure; 50 g Cholinchlorid wurden gemeinsam in einem 500-ml-Meßkolben in Wasser gelöst bzw. suspendiert. Pro kg semisynthetischer Diät wurden 10 ml dieses Vitaminpräparates zugesetzt.

Salzmischung. Nach (73, S. 278) wurde folgende Salzmischung zusammengestellt (USP XIV): 14 g Fe(III)NH_4-Citrat (28 Gew.% Fe); 78 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 42 g $MgCO_3$; 142 g $CaCO_3$; 264 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$; 401 g K_2HPO_4; 42 g $KHCO_3$; 120 g Na_3-Citrat $\cdot 2\ H_2O$; 50 g Na-Acetat; 100 mg $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$; 50 mg KJ; 600 mg NaF; 40 mg $Al(OH)(OAc)_2$; 240 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$; 200 000 I.E. Vitamin A-Acetat. Bei der Herstellung der semisynthetischen Diäten wurden 60 g Salzmischung/kg Diät zugesetzt.

Tubusfütterung. Zur Magentubusfütterung mittels Spritze diente eine im vorderen Viertel schwach gekrümmte Kanüle von 2 mm Durchmesser und ca. 13 cm Länge, deren kreisförmige Mündung leicht kugelartig verdickt und abgerundet worden war (Durchmesser: 2,5 mm), um sie schonender einführen zu können.

Schlachten der Tiere. Die Tiere wurden durch einen Schlag auf den Kopf betäubt und dann enthauptet. Anschließend wurde sofort die Leber vollständig entfernt und in eiskalte Krebs-Ringer-Lösung (65, 183) (Leberschnittversuche Kapitel II) oder Homogenisationspuffer (61) (alle übrigen Versuche) gelegt. Bei den Versuchen von Kapitel II wurden Füllung von Magen, Dünn- und Dickdarm als Bruchteile von 1 geschätzt und registriert. Die Leber wurde anschließend gewogen.

b) Leberschnittverfahren

Herstellung der Schnitte. Die Leber wurde in die sieben einzelnen Lappen zerteilt. Es empfiehlt sich, größerflächige Lappen der Länge nach zu halbieren, so daß schmalere Stücke entstehen, und dickere Leberlappen parallel zu ihrer Grundfläche in zwei flache Scheiben zu zerschneiden. Während dieser und der folgenden Handhabungen ruhte die Leber auf zwei übereinander gelegten, mit Krebs-Ringer-Lösung getränkten Rundfiltern, denen der Deckel einer größeren eisgefüllten Petrischale als Unterlage diente. Die ca. 0,5 mm dicken Schnitte (184) wurden mit Hilfe einer sehr dünnen Rasierklinge hergestellt, die an einem als Lineal verwendeten Objektträger in spitzem Winkel zur Leberoberfläche gleichmäßig und nicht zu langsam entlang gezogen wurde. Die Schnitte blieben meist an der Rasierklinge haften, wurden auf dem Filterpapier abgestreift und in kürzeren Zeitabständen mit einer spitzen Pinzette in eisgekühlte Krebs-Ringer-Lösung überführt.

Abwiegen der Schnitte. Die Schnitte wurden mit einer Pinzette aus der Pufferlösung gefischt, auf einer doppelten Lage Filterpapier ausgebreitet und sofort einmal auf frische Filter umgebettet (siehe auch S. 12-14). Sodann wurden ca. 500 mg Schnitte auf ein Uhrglas gebracht, mit einer Analysenwaage auf 1 mg genau gewogen und in ein eisgekühltes Inkubationskölbchen überführt, das 3,5 ml Krebs-Ringer-Lösung enthielt.

Inkubation der Schnitte. Als Inkubationsgefäße dienten 25-ml-Erlenmeyerkölbchen. Die Puffer und Leberschnitte enthaltenden Kölbchen wurden bei 37° unter Schütteln 10 min lang mit Carbogen durchgespült. Dann wurde die Einbaureaktion durch Zugabe von [1-^{14}C]-Acetatlösung (10 µMol in 0,5 ml Krebs-Ringer-Lösung, 0,5-1 · 10^6 Ipm) gestartet, nochmals 5 min lang mit Carbogen gespült und dann das Kölbchen dicht verschlossen. 2 h nach Start wurde die Reaktion durch 1 ml 16 M KOH gestoppt und 1 mg Cholesterol in 0,5 ml Äthanol zugesetzt.

Aufarbeitung der Ansätze. Der Kölbcheninhalt wurde durch Erhitzen im Sterilisationsautoklaven (1 h, 120°C) hydrolysiert, in einen 50-ml-Schütteltrichter überführt, das Kölbchen zweimal mit 2,5 ml Wasser, zweimal mit 5 ml Äthanol sowie einmal mit 10 ml Petroläther (Siedebereich 40-65°C) ausgespült und die Flüssigkeiten ebenfalls in den Scheidetrichter geschüttet. Sodann wurde 1 min lang kräftig geschüttelt, die Petrolätherphase durch ein kleines Faltenfilter filtriert und die Ausschüttelung zweimal mit je 10 ml Petroläther wiederholt. Die vereinigten Extrakte wurden, um letzte Spuren wäßriger Phase zu entfernen, welche wegen ihres hohen ^{14}C-Gehaltes das Ergebnis völlig verfälschen würden, abermals durch ein Faltenfilter in einen 100-ml-Rundkolben gebracht. Hatte man sich vergewissert, daß selbst geringste Spuren wäßriger Phase durch die Filtration beseitigt worden waren (man kann störendes ^{14}C-Acetat auch durch Schütteln des Petrolätherextraktes mit einer wäßrigen Natriumacetatlösung entfernen), so wurde der Petroläther abgezogen und der Rückstand in 2,5 ml Dioxan gelöst.

Bestimmung der Radioaktivität. 2,0 ml der Dioxanlösung wurden in ein Szintillationsgefäß überführt, das bereits 10 ml Szintillationsflüssigkeit (7 g PPO; 0,3 g POPOP; 100 g Naphthalin; 1 Lit. Dioxan) sowie 0,5 ml Wasser enthielt, gut umgeschüttelt und die Radioaktivität im Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer, Spannungseinstellung 4,3, Tritiumkanal, Zählzeit 1 min, bestimmt. Zur Bestimmung der Radioaktivität der

Substratlösung wurde diese 1 : 20 verdünnt. 0,1 ml der verdünnten Lösung + 0,4 ml Wasser + 2 ml Dioxan + 10 ml Szintillationsflüssigkeit wurden zur Messung eingesetzt.

Berechnung der Ergebnisse. Mit Hilfe der in Abb. 2b (S. 9) gezeigten linearen Beziehung wurden alle Ergebnisse auf 500 mg Leber bezogen. D.h. sie wurden in der Form: Acetateinbau in Cholesterol µMol/500 mg Leber/2 h angegeben. Diese Angabe ist noch zu erläutern. Für den Aufbau der Cholesterolmolekel aus Acetat werden mehr Moleküle gebraucht, als am Ende der Synthesekette als Bestandteil des Cholesterols wiedergefunden werden. Von 18 Molekeln Acetat erscheinen 12 C-1-Atome und 15 C-2-Atome in Cholesterol; 6 C-1-Atome und 3 C-2-Atome gehen als CO_2 verloren. Man sollte also besser anstelle von Acetateinbau in Cholesterol vom Einbau von Acetatcarboxyl-C-Atomen oder Acetatmethyl-C-Atomen sprechen.

Zur Berechnung vorliegender Versuchsergebnisse wurden nur die Acetatmolekeln berücksichtigt, deren 1-^{14}C-Atom schließlich in Cholesterol eingebaut wurde. Die Bezeichnung der Ordinate "Acetateinbau in Cholesterol" ist also hier folgendermaßen aufzufassen:

$$\frac{(\text{Ipm})_{\text{Unverseifbares (500 mg Leber, 2 h)}}}{\frac{(\text{Ipm})_{\text{Acetat}}}{\mu\text{Mol Acetat}}} = \begin{array}{l}\text{Einbau von Acetat}\\ \text{in Cholesterol}\\ \mu\text{Mol/500 mg Leber/2 h}\end{array}$$

Die Zahl der Acetatmolekeln, die wirklich am Aufbau von Cholesterol beteilig waren, ist also 1,5 mal größer als die Zahl der Acetatmoleküle, deren Carboxyl-C-Atom als Cholesterolbestandteil auftritt. Obige Angabe der Versuchsergebnisse ist ungenau, weil nicht Cholesterol allein, sondern alle unverseifbaren (petrolätherlöslichen) Substanzen bei der Bestimmung der Radioaktivität erfaßt werden.

c) Puromycinversuche

Zu Abb. 22a und b, S. 34. Die Ratten änderten ihr Gewicht während der 5tägigen Fütterung mit der proteinarmen Diät kaum. Die Intubation der Caseinhydrolysat-Lösung und die Puromycin-Injektionen wurden unter Äthernarkose ausgeführt. Puromycindihydrochlorid wurde entweder als Suspension in 0,04 M Natriumphosphat-Puffer,

pH 7.4, (Konzentration 10 mg/ml) oder als Lösung in Wasser (Konzentration 20 mg/ml) intraperitoneal verabreicht. Die Tiere wogen zu Beginn der Wiederfütterung ca. 90-120 g.

Normalerweise wurden, unabhängig vom Gewicht des Tieres, 3 ml Caseinhydrolysat-Lösung intubiert. Bei den längeren Wiederfütterungszeiten war der Magen aber bereits nach Intubation von ca. 2 ml erneut prall gefüllt. Von weiterer Zuführung von Hydrolysat wurde in solchen Fällen abgesehen, da sie das Tier unbedingt getötet hätte. Die Vergleichstiere bekamen keine Injektionen, die 0-h-Tiere auch keine Intubation. Nach Ablauf der angegebenen Wiederfütterungszeiten wurden die Tiere einer Gruppe (maximal 3) getötet. Ein Teil jeder Leber wurde sofort zu Schnitten verarbeitet. Pro Tier wurden 2 Inkubationen der Schnitte zur Bestimmung des Acetateinbaus in Cholesterol vorgenommen. Der andere Teil der Lebern wurde mit 4 ml 0,2 M K-Phosphatpuffer (0^0C, 0,02 M Thioglykol, pH 8.0) pro g Leber 2 min lang in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator zerkleinert und das Homogenat 1 h bei 105 000 g zentrifugiert. Der klare Überstand konnte ohne Verlust an Threonindehydratase mehrere Tage bei $+4^0$C aufbewahrt werden. Das Enzym wurde nach Holzer et al. (93) mittels optischem Test bei 25^0C bestimmt und die Aktivität auf den mit Hilfe der Biuretmethode ermittelten Proteingehalt der Lösung bezogen.

Zu Abb. 23, S. 35. Die Gewichte der verwendeten Ratten lagen zu Beginn der Wiederfütterungszeit zwischen 80 und 120 g. Da parallel zum Acetateinbau in Cholesterol keine Threonindehydratase-Aktivität bestimmt wurde, stand genügend Leber für 3 Inkubationen pro Tier zur Verfügung. Alle anderen Bedingungen wie oben (Abb. 22). Statistische Auswertung des Versuches: siehe unten. Zwei Werte, 0,082 bzw. 0,084 µMol/500 mg/2 h (12 bzw. 18 h Wiederfütterung, ohne Puromycin), wurden bei der Auswerung nicht berücksichtigt, da sie weit aus dem Rahmen der übrigen Werte fallen (Grund unbekannt).

d) Statistische Berechnung

Berechnung der t-Werte:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s/\bar{n}}$$

$$fs^2 = f_1 s_1^2 + f_2 s_2^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 + \sum (y_i - \bar{y})^2$$

$$f = n_1 + n_2 - 2$$

$$\sqrt{\bar{n}} = \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \; (= 1{,}58, \text{ wenn } n_1 = n_2 = 5)$$

Dabei bedeuten:

t:	Prüfgröße (Studentverteilung)
$\bar{x}$, $\bar{y}$:	Zwei auf Gleichheit zu prüfende arithmetische Mittelwerte
s_1, s_2, s:	Stichprobenstreuung
n_1, n_2:	Zahl der Individuen pro Stichprobe
f_1, f_2, f:	Freiheitsgrad
x_i, y_i:	Einzelwerte der beiden miteinander zu vergleichenden Stichproben

Die Hypothese der Gleichheit zweier Mittelwerte wurde als widerlegt betrachtet, wenn:

$t \geq 2{,}31$ (signifikante Abweichung: $\alpha = 0{,}05$)

$t \geq 3{,}36$ (hochsignifikante Abweichung: $\alpha = 0{,}01$).

Berechnung der Stichprobenstreuung:

$$s_1^2 = \frac{1}{f_1} \sum (x_i - \bar{x})^2 = \frac{\sum (x_i - x)^2}{n_1 - 1}$$

e) Angaben zu einzelnen Versuchen

Zu Abb. 5a, S. 12. Die Punkte sind Mittelwerte aus Versuchen mit 3 Ratten vom Gewicht 208, 182, 226 g. Aufbewahrung der Leberschnitte in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (183), pH 7.4, 0^0C; begast mit O_2. Umrechnung der Werte auf 100 g schwere Ratten (Abb. 9, S. 17) wurde vorgenommen.

Zu Abb. 5b, S. 12. Ratte A: 160 g; Ratte B: 142 g. Messung der Atmung in Warburg-Manometern und -Gefäßen. Im Einsatz: 0,2 ml 10%ige KOH; im Hauptraum: 2 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer und ca. 500 mg Leberschnitte. Diese wurden nach der entsprechenden Lagerungszeit in Puffer von 0^0 auf Filterpapier kurz von der größten Flüssigkeitsmenge befreit und in das Warburggefäß eingewogen. Von einem Aliquot der Schnitte wurde das Trockengewicht bestimmt (1 h, 110^0C). Alle Meßwerte wurden auf 100 mg Trockengewicht bezogen.

Zu Abb. 6, S. 13. Die Punkte sind Mittelwerte aus Parallelversuchen an 3 Ratten, Körpergewicht: 225, 230, 231 g. Alle Werte wurden auf Einheitsrattengewicht (100 g) umgerechnet (Abb. 9, S. 17). Die Leber jeder Ratte wurde vollständig zu Schnitten verarbeitet. Eine Leberschnittmenge, die nach Lagerung auf Filterpapier ca. 500 mg wog, wurde rasch auf der ersten Doppellage Filterpapier ausgebreitet. Zur Zeit t = 0 wurde begonnen, die Schnitte auf eine zweite Doppellage umzubetten. Nach der im Diagramm angegebenen Zeit t wurden je 150 mg dieser Schnitte für Inkubation mit Acetat und für DNS-Bestimmung abgewogen. Die Abszissenwerte repräsentieren die Lagerungszeiten auf dem zweiten Filterpapier.

Zu Abb. 7, S. 15. Körpergewichte (in g) der Ratten: 188 (0 h), 204 (5 h), 228 (10 h), 230 (20 h), 224 (30 h), 238 (40 h). Die Zahl in Klammer bedeutet die Wiederfütterungszeit in h. Nach 30 h Fasten Wiederfütterung mit Altromin. Von jeder Ratte 500 mg Schnitte zur DNS-Bestimmung verwendet. Die Eichkurve für die DNS-Bestimmung (hier nicht wiedergegeben) wurde mit ϕX-Phagen-DNS aufgenommen. Herr Dr. Zillig, MPI für Biochemie, München, stellte sie freundlicherweise zur Verfügung. Die Aktivitätswerte wurden nicht auf 100 g schwere Ratten umgerechnet, da nicht geklärt ist, ob die in Abb. 9, S. 17 gezeigte Kurve auch für kurzzeitig wiedergefütterte Ratten gilt.

Zu Abb. 8, S. 15. Körpergewichte (in g) der Ratten: 181 (0 h), 219 (5 h), 229 (10 h), 264 (20 h), 231 (30 h), 222, 235 (40 h), 229, 250 (55 h), 220, 235 (70 h), 279 (immer mit Altromin gefüttert, keine Fastenzeit). Ca. 500 mg Leberschnitte wurden 1 h auf 110^0C erhitzt, über P_2O_5 abgekühlt und gewogen. Die Gerade wurde nach der Methode der kleinsten Summe der Abweichungsquadrate als Ursprungsgerade berechnet.

Zu Abb. 9, S. 17. Körpergewichte (in g) der Ratten: 85, 89 (2 Tage); 221, 239 (11 Tage); 305, 297, 341 (20 Tage); 422, 426 (82 Tage). Die Zahl in Klammer gibt die Aufenthaltszeit in unserem Tierraum an.

Zu Abb. 10, S. 17. Die Wachstumskurven der beiden ca. 420 g schweren Ratten (Abb. 9) werden hier dargestellt. Die Zeit in Tagen auf der Abszisse wurde vom Tage des Eintreffens der Tiere an gerechnet. Sie entspricht – bis auf einen konstanten zu addierenden Zeitbetrag – der Lebenszeit der Tiere.

Zu Abb. 14, S. 21. Die Gewichte der verwendeten Ratten lagen im Bereich zwischen 70 und 150 g, vorwiegend jedoch zwischen 80 und 120 g. Alle Aktivitätswerte wurden auf 100 g-Ratten umgerechnet (Abb. 9, S. 17).

5. Zu Kapitel III (Untersuchungen zur Chemie der Mevalonsäure)

a) Bestimmung des Gehaltes von MVL-Lösungen

MVL-Lösung bekannten Gehaltes. 533 mg frisch im Vakuum destilliertes MVL wurden mit N/1000 HCl zu 100 ml gelöst (Konzentration 41 µMol/ml). Diese Lösung diente als Standard zur Aufnahme der Eichkurve für das Hydroxamsäureverfahren. 50 ml dieser Lösung wurden mit 0,56 ml 5 N NaOH 30 min unter Rückfluß erhitzt und abkühlen gelassen. Bei allen Messungen nach dem Hydroxamsäureverfahren wurde diese Na-MVA-Lösung benützt.

MVL-Bestimmung. Beim Verfahren von Lynen und Graßl (101) mußte, um die Bildung des stark gefärbten Fe^{3+}-Acetat-Komplexes zu vermeiden, eine höhere Salzsäurekonzentration als angegeben eingestellt werden. Somit wurde wie folgt verfahren: 0,4 ml einer MVL-haltigen (hier meist stark sauren) Lösung wurden mit 1,6 ml einer Hydroxylaminlösung von pH 7,05-7,10 (25°C) vermischt. (Die NH_2OH-Lösung wurde täglich frisch durch Mischen von 4 M $NH_2OH \cdot HCl$ und 4 M KOH (pH-Meter) hergestellt). Anschließend wurde 45 min bei 37°C inkubiert, mit 2,6 ml $FeCl_3$-Reagens versetzt und sofort die Extinktion bei 546 mµ bestimmt. Der Vergleichswert wurde mit einer MVA-Lösung analog erhalten. Das $FeCl_3$-Reagens wurde durch Mischen von je einem Volumteil der angegebenen (101) $FeCl_3$-, Na-Acetat- und Trichloressigsäurelösungen und 1,6 Volumenteilen einer 3 M HCl hergestellt.
Aus einer mit der MVL-Standardlösung gewonnenen Eichgeraden ließ sich ein Extinktionskoeffizient berechnen, der nur um 2% höher lag als der von Lynen und Graßl (101) angegebene. Auf die Wiedergabe der Eichgerade kann somit verzichtet werden.

Messung der MVL-Bildung, an einem Beispiel beschrieben (Kurve II, Abb. 25, S. 39): 1,50 ml der MVA-Lösung wurden mit 3,90 ml H_2O verdünnt und auf 25°C gebracht. Sodann wurde durch rasches Zumischen von 0,60 ml 1 N HCl die MVL-Bildung in Gang gesetzt (t = 0). Zu bestimmten Zeiten t entnommene Aliquote von 0,40 ml wurden in

1,60 ml NH_2OH-Lösung (s.o.) pipettiert. Das pH der NH_2OH-Lösung änderte sich dadurch nicht merklich. Dann wurde wie oben weiterverfahren.

b) Messung des MVL/MVS-Gleichgewichtes

1 ml der oben beschriebenen MVA-Lösung wurde mit 1 ml H_2O verdünnt und dann mit 1 ml einer Mischung versetzt, die, je nach zu erreichendem pH-Wert, 0,1 N HCl und 1 M Na-Acetat in wechselndem Verhältnis enthielt. Sodann wurde das pH mit einem Präzisionsinstrument bei 22°C gemessen. Nach 19, 237 und 355 h Inkubation bei 22° wurde an Aliquoten die MVL-Konzentration bestimmt. Um die Gleichgewichte auch von der Seite des MVL her zu realisieren, wurde analog 1 ml der oben beschriebenen MVL-Lösung anstelle der MVA-Lösung eingesetzt. Da aber die Gleichgewichtseinstellung hier sehr viel langsamer erfolgte als bei der MVA-Lösung waren die Systeme nach 355 h vom Gleichgewichtszustand noch weit entfernt. Die Meßwerte werden deshalb nicht mitgeteilt.

c) Verlauf der MVL-Bildung, gaschromatographisch bestimmt

MVA-Lösung. Um einigermaßen genau messen zu können, mußte die Kinetik an einer konzentrierten MVA-Lösung untersucht werden. 420 mg frisch destilliertes MVL wurden mit 0,33 ml 10 N KOH versetzt, kurz auf 100° erwärmt und nach Abkühlung auf 1,00 ml aufgefüllt. Man erhielt eine 3,24 M K-MVA-Lösung.

Kinetik (1. Versuch). 50 µl MVA-Lösung wurden sehr rasch mit 50 µl 5 N HCl vermischt (t = 0). Sofort wurden 20 µl Mischung in eine 25-µl-Spritze aufgezogen. Zu bestimmten Zeiten t wurden Proben von 1 µl aus der Spritze gedrückt und mit 65 µl eines TMS-Agens vermischt. Sodann wurden 35 µl BTMSAA zugesetzt, wodurch sich der entstandene Ammonchlorid-Niederschlag wieder auflöste und eine fast klare Lösung entstand. Die noch vorhandene Trübung (KCl) störte bei der Gaschromatographie nicht. Das TMS-Agens bestand aus 8,5 ml HMDS, 4,0 ml TMCS, 25 µl TDSME und wasserfreiem Pyridin ad 25 ml (21°C).

Kinetik (2. Versuch). An die Wand im unteren Drittel eines Zentrifugenglases, auf dessen Boden sich 130 µl TMS-Agens (s.o.) befanden, wurden mit µl-Spritzen je 1 µl MVA-Lösung und 5 N HCl im Abstand weniger Millimeter geheftet, mit einem Glas-

faden zu einem Tropfen vereinigt (t = 0). Zum Zeitpunkt t wurde das Tröpfchen mit dem TMS-Agens überspült. Nach Zusatz von 70 µl BTMSAA wurde gaschromatographiert. Den Meßwert bei t = 0 erhielt man, wenn man H_2O anstelle von HCl einsetzte.

Gaschromatographie. 5,7 µl der zu analysierenden Lösungen wurden in den 270° heißen Injektorblock eines Aerograph 1520 Gaschromatographen injiziert. Säulentemperatur zunächst 145°, nach Auftreten des TTMSMVA-Gipfels (Abb. 31) Temperaturerhöhung auf 185°. Säulenmaterial: ⅛"-Edelstahlsäule, 1,5 m; Chromosorb W a.w. 80-100 mesh, beladen mit 15% NPGS. Trägergas He, 25 ml/min. FID, Detektortemperatur 300°, 22 ml H_2/min, ca. 300 ml Luft/min.

Eichung des Detektors. Da selbst geringe Mengen SiO_2, die sich auf den Elektroden niederschlugen, die Detektorempfindlichkeit stark änderten, mußte mit innerem Standard gearbeitet werden. Das Ziel dabei ist, einen Eichfaktor f zu gewinnen. Da diese Methode in Kapitel IV besprochen wird, sei dorthin (S. 68) verwiesen. Eine bestimmte Menge K-MVA-Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und mit TMS-Agens + BTMSAA versetzt. Injektion steigender Mengen von 0,7-3,7 µl in den Gaschromatographen, Ausmessen der entsprechenden Gipfelflächen nach der Dreiecksmethode und alles weitere wie in Kapitel IV. Analog wurde mit einer Lösung bekannten Gehalts von (präparativ hergestelltem, S. 124) MVLTMS in Pyridin, die ebenfalls TDSME als inneren Standard enthielt, verfahren. Die Eichfaktoren f waren: für TDSME/TTMSMVA 1,70, für TDSME/MVLTMS 1,51.

d) Wassereliminierung aus MVL

In Methanol. In einem 100-ml-Rundkolben mit Rückflußkühler und Trockenrohr wurden 1,04 g (8,0 mMol) MVL in 50 ml wasserfreiem Methonol mit 2,5 ml Borfluoridätherat 24 h unter Rückfluß erhitzt.

In Äthanol. Es wurde wie bei Verwendung von Methanol verfahren, außer daß diesmal 1,13 g (8,7 mMol) MVL in 50 ml wasserfreiem Äthanol gelöst wurden.

Beide Reaktionsansätze wurden dann bei ZT mit Natriummethylatlösung in Methanol bzw. -äthylatlösung in Äthanol bis zum Farbumschlag von Phenolphthalein versetzt, wobei ein farbloser kristalliner Niederschlag entstand. Die nach Abziehen des Lösungs-

mittels zurückbleibende feste farblose Masse wurde viermal mit je 30 ml Wasser- und peroxidfreiem Äther eluiert (Aufschlämmen, Zentrifugation), die vereinigten Eluate im Vakuum von Äther befreit und der bernsteinfarbene zähflüssige Rückstand zweimal der Kurzwegdestillation bei ca. 1 Torr unterworfen (Siedebereich 84-90°). Ausbeute nach der 2. Destillation: Ansatz in Methanol: 0,46 g (47% der Theorie), Ansatz in Äthanol 0,83 g (85% der Theorie). Die schlechte Ausbeute beim Ansatz in Methanol rührt daher, daß die Aufbereitungsmethode noch nicht befriedigend entwickelt war.

Kinetik der Wassereliminierung. Zu einer siedenden Lösung von 1 g MVL in 50 ml wasserfreiem Äthanol wurden zum Start der Reaktion 2,5 ml Borfluoridätherat gegeben und weiter zum Sieden erhitzt. Zu verschiedenen Zeiten nach Reaktionsbeginn wurden der Mischung Proben von 1 ml entnommen und bis zur gaschromatographischen Analyse bei -18° aufbewahrt. 1,8 µl der nun auf 0° erwärmten Proben wurden in den Gaschromatographen injiziert. Retentionszeiten für Lactenon 4,86 min, für MVL 19,5 min.

Gaschromatographie. Aerograph 1520, ⅛" Edelstahlsäule, Länge 1,5 m, 16% NPGS auf Chromosorb W a.w. 80-100 mesh. Trägergas: He, 2,5 ml/min. FID, Detektortemeratur 300°, 22 ml H_2/min, ca. 300 ml Luft/min. Temperatur des Injektors: 225°, des Säulenofens: 190°.

e) Darstellung von MVLTMS

1,06 g MVL (8,1 mMol), gelöst in 3 ml wasserfreiem Pyridin, wurden bei ZT in einer geschlossenen Apparatur unter Rühren während 5 min aus einem Tropftrichter in ein 25-ml-Rundkölbchen getropft, das eine Mischung von 5 ml Pyridin, 2,4 ml (1,86 g, 23,1 mVal) HMDS und 1,2 ml (1,03 g, 9,5 mVal) TMCS enthielt. Es entstand ein farbloser kristalliner Niederschlag (NH_4Cl). Anschließend wurde 30 min auf 40-50° erwärmt und nach Abkühlung auf ZT der Niederschlag im geschlossenen Glas abzentrifugiert. Vom klaren Überstand wurden im Vakuum nicht umgesetztes TMCS,HMDS und Pyridin abgezogen (40°) und der Rückstand zweimal der Kurzwegdestillation im Vakuum unterworfen. Bei etwa 150° ging nahezu der gesamte Inhalt des Kölbchens in einer einzigen Fraktion als farbloses Öl über. Ausbeute nach der 1. Destillation: 1,25 g (6,2 mMol, 76% der Theorie). Um die luftfeuchtigkeitsempfindliche Substanz noch reiner zu erhalten, wurde sie der Hochvakuumdestillation in einer Anlage unterworfen, die es gestattete absolut wasserfrei zu arbeiten.

f) Inkubation von MVL mit Diazomethan

154 mg MVL (1,2 mMol) wurden in einem 100-ml-Rundkolben in 10 ml wasserfreiem Methanol gelöst und mit 5 ml einer ätherischen Diazomethanlösung versetzt, die das aus 0,8 g (ca. 8 mMol) Nitrosomethylharnstoff erhaltene Diazomethan (185) enthielt. Das verschlossene Reaktionsgefäß wurde bei 4^0 aufbewahrt. Die gelbe Farbe der Lösung verblaßte im Laufe eines Tages etwas, wobei sich farblose Flocken (Polymethylen) abschieden. In den folgenden Tagen wurden mehrmals erneut 5 ml Diazomethanlösung zugegeben. Nach 3 Tagen wurde ein Teil der Lösung bei ZT im Dunkeln aufbewahrt und auch jetzt mehrmals Diazomethan zugegeben. Nach 20 Tagen wurde das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in je 5 ml Tetrahydrofuran (wasser- und peroxidfrei) aufgenommen. 3 µl dieser Lösungen wurden zur gaschromatographischen Analyse verwendet. Retentionszeit des MVL: 19,2 min (übrige gaschromatographische Bedingungen S. 124).

6. Zu Kapitel IV (Verfahren zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität)

a) Darstellung von HMGDME und MGSDME

HMGDME. 1,00 g (6,2 mMol) HMGS wurden in einem 50-ml-Rundkolben in 5 ml wasserfreiem Methanol gelöst und unter Rühren aus einem Tropftrichter langsam mit einer wasserfreien ätherischen Lösung von Diazomethan versetzt. Nach beendeter Reaktion wurden die Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand der Kurzwegdestillation im Vakuum unterworfen. Bei $85-90^0$/ca. 0,5 Torr gingen 1,09 g (5,7 mMol, 93% der Theorie) einer farblosen Flüssigkeit über. Analyse: % C: 50,81, % H: 7,53; theoretisch für HMGDME % C: 50,52, % H: 7,42.

MGSDME und MGS-Anhydrid. Ein nach Feist (124) aus 16 g Isodehydracetsäureäthylester (186) hergestelltes Gemisch der stereoisomeren MGS wurde in Methanol mit Diazomethan behandelt. Da die Reaktion zu langsam verlief, wurde das Lösungsmittel wieder abgezogen und der Rückstand im Vakuum destilliert. Eine erste Fraktion ($95-101^0$/ca. 1 mm, 0,8 g, $n_D^{26^0}$: 1,4555) war ein Gemisch der Ester. Oberhalb 100^0 Badtemperatur trat zunächst starke Gasentwicklung auf, ohne daß sich eine Substanz in der Vorlage ansammelte. Lediglich in der Kühlfalle hatte sich Wasser abgeschieden. Bei $146-147^0$ Badtemperatur/ca. 1 Torr ging eine gelbliche Flüssigkeit über, die in der

Vorlage erstarrte. Sie wurde (6,2 g) in ca. 200 ml absolutem Äther gelöst und bei ZT durch Zusatz von ca. 300 ml n-Hexan zur Kristallisation gebracht. Es bildeten sich sehr langsam feine farblose Nadeln. Nach Stehenlassen über Nacht bei 4^0 wurde abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Smp. 87-89^0. Die wäßrige Lösung reagiert stark sauer (das Enol ist ein α-Pyronabkömmling). Analyse: % C: 57,14, % H: 4,90; theoretisch für MGS-Anhydrid: % C: 57,61, % H: 4,80. 1,6 g des Anhydrids wurden 3 Tage mit absolutem Methanol, das 5% H_2SO_4 enthielt, bei ZT stehengelassen (187), dann die Säure mit einer methanolischen Na-Methylatlösung neutralisiert, Na_2SO_4 abzentrifugiert und mit Äther gewaschen, alle Flüssigkeiten vereinigt, die Lösungsmittel abgezogen und die Ester erneut unter Vakuum destilliert.

Präparative Trennung der isomeren MGSDME mittels Gaschromatographie: Aerograph 1520, ¼" Edelstahlsäule, 3 m, 16% NPGS auf Chromosorb W a.w. 80-100 mesh; Trägergas He, 100 ml/min. Temperaturen: Injektorblock 210^0, Säulenofen 155^0, Detektorofen 301^0. Injektion 50 µl Estergemisch ohne Lösungsmittel. Auffangen der Fraktionen in mit Trockeneis/Trichloräthylen gekühlten Fallen am Ausgang des WLD. Die so erhaltenen Fraktionen mußten nochmals im Hochvakuum destilliert werden, da sie noch Verunreinigungen (wahrscheinlich NPGS-Zersetzungsprodukte) enthielten ($40-45^0/10^{-3}$ Torr). Fraktion I (cis-MGSDME): % C: 56,03 (theor.: 55,80), % H: 7,17 (theor.: 7,03); Fraktion II (trans-MGSDME): % C: 56,28 (theor.: 55,80), % H: 7,05 (theor.: 7,03).

b) Darstellung von [5-^{14}C]-HMG-CoA

Sämtliche zur Herstellung der Inkubationsmischung nötigen Lösungen (außer den Enzymlösungen, bei denen dies nicht möglich war) wurden mit CO_2-freiem Wasser hergestellt. Die $K_2{}^{14}CO_3$-Lösung wurde bereitet, indem das aus $Ba^{14}CO_3$ mit Säure freigesetzte $^{14}CO_2$ in carbonatfreier KOH absorbiert wurde. Eine solche Lauge erhält man aus einer 0,1 M KCl-Lösung auf einer Säule, die mit Amberlite IRA 400 (OH^--Form) gefüllt ist (188).

Die Inkubationsmischung enthielt (Inkubation bei 23^0C unter N_2 im geschlossenen Reaktionsgefäß ausgeführt): 100 mM Tris HCl, pH 7.2; 2,5 mM $MgCl_2$; 0,25 mM Mg-EDTA; 0,05 mg /ml Serumalbumin; 1,75 mM ATP; 7,5 mM $K_2{}^{14}CO_3$ (32,5 mC/mMol); 1,22 mM β-Methylcrotonyl-CoA. Die Inkubation dauerte 130 min. Bei t = 0, 17, 37, 73 min wurden jeweils 0,2 I.E. β-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und 0,13 I.E. β-Metylglutaconyl-

CoA-Hydratase zugesetzt. Volumen zu Beginn der Inkubation: 7,6 ml, am Ende: 8,2 ml. Obige Konzentrationsangaben beziehen sich auf ein mittleres Endvolumen von 8,0 ml. Im übrigen wurde verfahren, wie bereits früher (61) berichtet.

c) Bestimmung der Radioaktivität der [5-^{14}C]-HMG-CoA-Lösung

Zur Bestimmung der Radioaktivität der auf diese Weise bereiteten [5-^{14}C]-HMG-CoA-Lösung wurden 0,025 ml davon in einem 25-ml-Meßkolben mit Wasser zur Marke aufgefüllt, 1,00 ml der verdünnten Lösung mit 40 µMol HCl versetzt und im Vakuum zur Trockne eingedampft, um restliches $^{14}CO_2$ zu entfernen. Der Rückstand wurde in 1,50 ml H_2O gelöst, davon 1,00 ml in einem Szintillationsgefäß mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (S. 116) vermischt und die Radioaktivität bestimmt. Nun wurde mit einer genau abgewogenen Menge von ca. 20 mg [1-^{14}C]-n-Hexadecan als innerem Standard die Zählausbeute bestimmt. Aus 5 Bestimmungen solcher Art wurde ein Mittelwert für die Radioaktivität der Lösung, ausgedrückt in dpm/ml, errechnet.

Um den Anteil von ^{14}C-HMG-CoA an der Gesamtradioaktivität der Lösung kennenzulernen, wurde 1 ml des Präparates (1/10 dieser Menge würde zum zu schildernden Zweck ausgereicht haben, aber wir benötigten aus hier nicht interessierenden Gründen eine solche Menge) mit 0,25 ml 4 N KOH 1 h bei 30°C inkubiert. Nach Neutralisation mit 2 N H_2SO_4 gegen Phenolphthalein wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 0,1 ml 2 N H_2SO_4 aufgenommen, mit 4 g Na_2SO_4 gut vermischt und verschlossen über Nacht stehen gelassen. Dann wurde mit peroxid- und wasserfreiem Äther eluiert: einmal mit 3 ml, dreimal mit je 2 ml. Die vereinigten Eluate wurden von Äther befreit und der Rückstand mit einigen ml einer Lösung von Diazomethan in Äther (185) gelöst, 10 min bei 0°C stehengelassen, überschüssiges Diazomethan und Äther abgezogen, Trägermengen der 3 Methylester zugegeben und in 0,2 ml Cyclohexan erneut gelöst. 10 µl-Aliquote wurden in den Gaschromatographen injiziert. Temperaturen: Injektor 215°, Säulenofen 182°, Detektorofen 310°, Trägergas He 25 ml/min. $^1/_8$" x 3 m-Edelstahlsäule, 14 % NPGS auf Chromosorb W a.w., 80-100 mesh. An den Ausgang des WLD war die weiter unten näher beschriebene Radiogaschromatographie-Einrichtung angeschlossen.

Zu Abb. 41, S. 61. Gaschromatographische Bedingungen wie eben beschrieben. Zuordnung der Gipfel in Abb. 41 (die folgende Tabelle 22 gibt die Mittelwerte aus 6 Injektionen wieder:

Gipfel Nr.	Substanz	Zeit min von Injektion bis zum Auftreten des		Zeitdifferenz min Radioaktivitäts- minus Massengipfel
		Massengipfel	Radioaktivitätsgipfel	
1	cis-MGSDME	9,08	9,47	0,39
2	trans-MGSDME	11,61	12,01	0,40
3	HMGDME	15,14	15,57	0,43

d) HMG-CoA-Gehalt

In eine 1-cm-Glasküvette wurden nacheinander pipettiert: 0,200 ml 1 M Tris/HCl, pH 8.0; 0,521 - x ml H_2O; 0,100 ml 0,1 M $MgCl_2$; 0,010 ml 0,35 M Thioglycolat (tägl. frisch bereitet); 0,100 ml 0,1 M D,L-Malat; 0,050 ml 0,03 M DPN. Nun wurde bei λ = 334 mμ, 25°C die Extinktion bestimmt: E_1 (Abb. 60). Sodann wurden 0,010 ml Malatdehydrogenase (5 mg/ml) hinzugefügt und nach Einstellung des Gleichgewichts erneut die Extinktion abgelesen: E_2. Zusatz von 0,002 ml Citratsynthase (2 mg/ml; 140 I.E./ml) und 0,007 ml HMG-CoA-Lyase (2,6 mg/ml; 3,2 I.E./ml) ergab einen schwachen Blindlauf (lineare Extinktionszunahme mit der Zeit). Nach ca. 2 min wurden x ml (z.B. 0,020 ml) einer HMG-CoA-Lösung zugegeben. Durch die Verdünnung der Lösung sank die Extinktion zunächst, wurde aber dann wegen der nun eintretenden DPNH-Bildung rasch überkompensiert. Dieser Verdünnungseffekt konnte gemessen werden, wenn in einem gesonderten Versuch anstelle von HMG-CoA-Lyase ein gleiches Volumen Wasser zugegeben wurde, im übrigen aber verfahren wurde wie eben geschildert. Ab ca. 6 min nach HMG-CoA-Zusatz war alles Acetyl-CoA verbraucht und die Zunahme der Extinktion geschah nur noch mit der Steigung des Blindlaufes. Bei geringerer Lyase-Aktivität oder größeren HMG-CoA-Mengen kann diese Phase länger dauern.

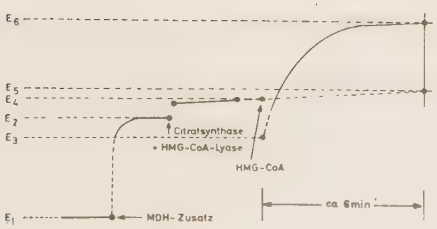


Abbildung 60

Schematische Darstellung des Verfahrens zur Konzentrationsbestimmung einer HMG-CoA-Lösung mit Hilfe eines zusammengesetzten optischen Tests. MDH = Malat-Dehydrogenase.

Für die Berechnung der HMG-CoA-Konzentration aus den Extinktionswerten der Abb. 60 werden folgende Größen benötigt:

$\Delta E_1 = E_2 - E_1$	Extinktionsänderung durch Einstellung des Malatdehydrogenase-Gleichgewichtes
$\Delta E_2 = E_4 - E_3$	Verdünnungseffekt durch Zugabe der HMG-CoA-Lösung
$\Delta E_3 = E_6 - E_5$	Extinktionsänderung gegenüber dem Blindlauf nach Zugabe von HMG-CoA

Damit läßt sich die HMG-CoA-Menge durch sinngemäße Anwendung der von Buckel und Eggerer (129) hergeleiteten Formel errechnen:

$$n_{HMG\text{-}CoA} = \frac{(\Delta E_2 + \Delta E_3)\, V}{d} \left(1 + \frac{\Delta E_1}{\Delta E_1 + \Delta E_2 + \Delta E_3}\right) \mu Mol \qquad (23)$$

In diesen Versuchen besaßen folgende Größen der Gl. (23) die Zahlenwerte:

$$\varepsilon_{DPNH}^{334\ m\mu} = 6{,}00\ cm^2\ \mu Mol^{-1}\ ;\ V = 1{,}000\ cm^3\ ;\ d = 1{,}00\ cm\ .$$

e) Aktivitätsbestimmung löslicher HMG-CoA-Lyase

Im Prinzip wurde das gleiche Verfahren wie zur HMG-CoA-Bestimmung verwendet. In eine 1-cm-Glasküvette wurden nacheinander einpipettiert: 0,200 ml 1 M Tris/HCl, pH 8.0; 0,460 - x ml H_2O; 0,100 ml 0,1 M $MgCl_2$; 0,010 ml 0,35 M Thioglycolat (s.o.); 0,100 ml 0,1 M D,L-Malat; 0,050 ml 0,03 M DPN; 0,010 ml Malatdehydrogenase (5 mg/ml); 0,060 ml 2,4 mM HMG-CoA (hergestellt nach Hilz et al. (122)); 0,010 ml Citratsynthase

(s.o.). Nun wurde die linear mit der Zeit verlaufende Extinktionsänderung bei 334 mμ, 25^0, einige min lang verfolgt (Blindlauf). Sodann wurden x ml des zu untersuchenden Lyase-Präparates zugesetzt. Nach einer von Präparat zu Präparat verschieden langen, maximal ca. 6 min, im allgemeinen aber höchstens 2 min dauernden Periode, in der die Reaktionsgeschwindigkeit laufend anstieg, blieb die Reaktionsgeschwindigkeit längere Zeit konstant, d.h. die Extinktion nahm linear mit der Zeit zu (Testlauf). Aus der Differenz der Steigungen von Test- und Blindlauf wurde die Enzymaktivität A berechnet:

$$A = \frac{1000\ V\ (\Delta E_T - \Delta E_B)}{\varepsilon \cdot d} \qquad (24)$$

Dabei sind:

A	Enzymaktivität in mE. Eine Einheit ist die Enzymmenge, die pro min 1 μMol DPNH entstehen läßt (d.h. HMG-CoA spaltet)
ΔE_T	Steigung des Testlaufes min^{-1}
ΔE_B	Steigung des Blindlaufes min^{-1}
V	Volumen der Reaktionsmischung ml
ε	Extinktionskoeffizient von DPNH, bei 334 mμ 6,0 $cm^2/\mu Mol$
D	Schichtdicke cm

Abb. 61 zeigt, daß die mit diesem Test gefundene Aktivität proportional der eingesetzten Enzymmenge ist. Das untersuchte Präparat war relativ roh, da seine Reinigung lediglich bis einschließlich Hitzeschritt des Verfahrens von Lynen et al. (181) vorangetrieben worden war. Proteinkonzentration war 2,25 mg/ml.

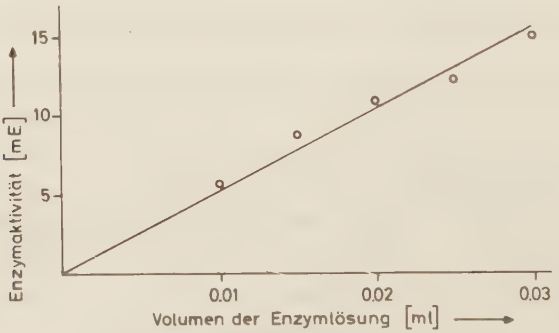


Abbildung 61

Abhängigkeit der HMG-CoA-Lyase Aktivität von der Enzymmenge

f) Aktivitätsbestimmung der HMG-CoA-Reduktase

Inkubation. Die Suspension der Lebermicrosomen wurde nach einer bereits früher (61) mitgeteilten Vorschrift hergestellt. Sie wurde vor der Verwendung auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml (189) gebracht. Die Testmischung enthielt 0,1 M Tris/HCl, pH 7.2; 0,02 M K-EDTA, pH 7.2; 0,02 M Cystein (ca. pH 7); 0,5 mg/ml Serumalbumin; 0,01 M Glucose-6-phosphat, pH 7.2; 1 mM TPN; 10 µg/ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (110 I.E. Enzym-Stammlösung); 0,075 mM [5-^{14}C]-HMG-CoA (spez. Radioaktivität 5,96 · 10^7 dpm/µMol); 2 mg/ml Microsomenprotein. Das Volumen wurde mit Leberhomogenisationsmedium (61) so eingestellt, daß es nach Start der Reaktion durch Zugabe der Microsomensuspension 0,200 ml (in manchen Versuchen 0,500 ml) betrug. Bereits vor dem Schlachten der Tiere wurden alle Ingredientien außer Cystein und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase gemischt und die Mischung eingefroren aufbewahrt. Erst kurz vor dem Start der Reaktion wurde aufgetaut und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Cystein hinzugefügt. Inkubiert wurde 1 h lang bei 37°C in geschlossenen Reagensröhrchen von 80 mm Länge und 8 mm Durchmesser. Danach wurden 5 oder 10 µMol unmarkiertes MVA zugefügt und die Reaktion durch Erhitzen auf 85° (3 min) gestoppt.

Vorbereitung der Proben für die gaschromatographische Analyse

Der Inhalt der Röhrchen wurde quantitativ in größere Zentrifugengläser überführt und entweder mittels Rotationsverdampfer bei 40° eingedampft; oder im Vakuumexsikkator über konz. H_2SO_4 aufbewahrt, wobei gleichzeitig mit einer IR-Lampe bestrahlt wurde. Mit letzterer Methode konnte eine große Zahl von Proben gleichzeitig in ca. einem Tag eingedampft werden. Der Rückstand wurde in 0,2 ml 1 N H_2SO_4 aufgenommen. Um das Wasser zu binden, wurde gründlich mit 3 g Na_2SO_4 vermischt und über Nacht stehen gelassen (101). MVL wurde mit zunächst 4 ml, dann dreimal 2 ml peroxid- und wasserfreiem Äther eluiert. Es erwies sich als günstig, jedesmal nach Verrühren mit Äther mit einer Tischzentrifuge möglichst hochtourig zu zentrifugieren. Der überstehende Äther konnte dann leicht dekantiert werden, ohne daß Na_2SO_4-Körner mitgerissen worden wären. Die Eluate einer Probe wurden in einem Zentrifugenglas mit Normalschliff und kegelförmig zulaufendem Boden gesammelt und der Äther durch Eintauchen der offenen Gläser in ein Wasserbad von 37°C verdampft. En warmer Luftstrom, über die Gläser geblasen, beschleunigte den Vorgang sehr.

Zur Trimethylsilierung wurde der Rückstand in 0,190 ml eines TMS-Agens (S. 122 unten) gelöst. Das Zentrifugenglas wurde mit einem Schliffstopfen verschlossen, um den Zutritt von Feuchtigkeit zu verhindern. Dann wurde kurz zentrifugiert, wodurch an der Wandung haftende Lösung in den kegelförmigen Teil des Glases befördert wurde. Nach Zugabe von 10 µl BTMSAA löste sich der NH_4Cl-Niederschlag auf. Aus dem oben genannten Grunde wurde noch einmal kurz zentrifugiert und im Eisbad aufbewahrt.

g) Gaschromatographische Analyse

Gaschromatographie. Ein sanfter Stickstoffstrom, über einen $CaCl_2$-Trockenturm von Wasserdampf befreit und in die Mündung des Zentrifugenglases geleitet, verhinderte den Zutritt von Luftfeuchtigkeit, während mit einer µl-Spritze 50 µl dem auf ZT erwärmten Glas entnommen wurden. Diese Lösungsmenge wurde in den ca. 250° heißen Injektorblock eines Gaschromatographen injiziert. Es schloß sich eine wendelförmige Trennsäule von 1,5 m Länge und ⅛" Außendurchmesser (Wandstärke 0,25 mm) an, die mit 14 % NPGS auf Chromosorb W a.w. 80-100 mesh gefüllt war. (Temperatur des Säulenofens 190°). Ein He-Strom von ca. 25 ml/min ließ die injizierten Substanzen über den WLD (Heizstromstärke der WX-Filamente: 150 mA; Temperatur des Detektorblocks 300°) und über eine 290° heiße Verbindungsleitung in das auf 750° vorgeheizte CuO-Rohr des Verbrennungsofens gelangen. Bei der Verbrennung entstandenes H_2O wurde in einem Magnesiumperchlorat-Rohr absorbiert. Das Gemisch aus He und $^{14}CO_2$ durchströmte nun die mit Anthracenkristallen gefüllte Durchflußzelle des Szintillationszählers. Ein dahinter geschaltetes Natronasbest-Rohr verhinderte den Austritt radioaktiven Kohlendioxids in die Umgebung. Es erwies sich für die Genauigkeit der Methode als vorteilhaft, die Geschwindigkeit des Gasflusses zu messen, während das aus MVLTMS gebildete $^{14}CO_2$ die Szintillationszelle durchströmte (Seifenblasenströmungsmesser am Ausgang des Natronasbest-Rohres). Vor Auftreten des MVLTMS-Radioaktivitätsgipfels wurde während einer halben min die Zahl der vom Detektor wahrgenommenen Impulse als Blindwert der Radioaktivität gemessen, anschließend die Zahl der Impulse, die dem MVLTMS-Gipfel entsprachen und die Zeit, während der die Impulse in den Detektor eingefallen waren, bestimmt. Das Radioaktivitätsdiagramm dient lediglich als Indikator dafür, wann die Integration des Radioaktivitätsgipfels, also die Bildung des Integrals $\int I\,dt$ (I = Impulsrate min^{-1}), zu beginnen und zu enden hat.

Das CuO-Rohr mußt nach 5 Injektionen durch ein frisch gefülltes ersetzt werden, da das Füllmaterial fast vollständig zu Cu reduziert worden war. Der Austausch ging aber rasch vonstatten, da der Ofen nicht vorher abgekühlt zu werden brauchte.

Herstellung der Trennsäulen. $^1/_8$" Edelstahlrohr wurde mit Wasser und organischen Lösungsmitteln gereinigt und leer in die für den Gaschromatographen erforderliche Wendelform gebogen. An das eine Ende der Wendel, das mit einem Glaswollepfropf von einigen cm Länge verschlossen war, wurde schwaches Wasserstrahlvakuum angelegt. Das andere Ende, durch einen Schlauch mit einem Trichter verbunden, diente der Einfüllung des mit stationärer Phase beladenen Trägermaterials. Dabei besorgten Vakuum und Vibrationen dichte und schonende Packung der Säule. Mit zunehmender Füllung wurde das Vakuum verstärkt. Als die Säule kein Material mehr aufnahm, wurde, um Platz für einen abschließenden Glaswollepfropf zu schaffen, die Säulenfüllung auf einigen cm Länge wieder entfernt. Vor Gebrauch wurde die Säule im Gaschromatographen mit 2^0/min von ZT auf 220^0 (NPGS-Säule) erhitzt und bei dieser Temperatur ca. 48 h "gebacken" (Trägergas He, 25 ml/min).

Bereitung des Säulenfüllmaterials. 60 g Chromosorb W (80-100 mesh, frisch gesiebt) wurden in einen 1-Ltr.-Rundkolben eingetragen, der 250 ml 6 N HCl enthielt. Unter gelegentlichem gelindem Umschwenken wurde im Wasserstrahlvakuum bei ZT 48 h stehen gelassen, die Kieselgur vorsichtig abgesaugt, mit Wasser säurefrei gewaschen, in 250 ml Pyridin aufgenommen, behandelt wie soeben für die HCl-Waschung beschrieben und 24 h bei 110^0 getrocknet.

Zur Beladung des Trägermaterials wurden 20 g gewaschenes und getrocknetes Chromosorb (genau gewogen) in eine Lösung von 15 g NPGS in 100 ml $CHCl_3$ (frisch über eine mit basischem Aluminiumoxid gefüllte Säule gereinigt) eingetragen. Es wurde so schwach evakuiert, daß die Lösung nicht siedete. Unter schwachem Vakuum (gelegentliches Umschwenken) wurde ca. 1 h stehen gelassen. Nachdem das Chromosorb unter gelindem Unterdruck – und ohne Abzupressen – abgesaugt worden war, wurde es zuerst auf hartem Papier an der Luft, dann bei 110^0 getrocknet (12 h), nach Abkühlung gewogen und die Beladung berechnet. Sie betrug 14-16%. Die Säulen besaßen ca. 800 Trennstufen/m für MVLTMS, berechnet nach (190).

Präparative Darstellung von BTMSAA. BTMSAA wurde nach der Vorschrift von Klebe et al. (132) mit einem Achtel der dort angegebenen Ansatzgröße synthetisiert und durch zweimalige Fraktionierung im Hochvakuum von Trimethylsilylacetamid getrennt. Fraktionen, die völlig frei waren von letzterer Substanz, färbten sich auch nach monatelangem Stehen bei ZT nicht braun.

Das NMR-Spektrum des isolierten Produktes enthält 2 Signale, die 3 bzw. 18 Protonen entsprechen, bei τ = 8,19 ppm bzw. τ = 9,96 ppm, wie für BTMSAA zu erwarten.

h) Eichung der gaschromatographischen Massenbestimmung von MVLTMS

In ein 1-ml-Meßkölbchen wurde eine immer möglichst gleiche Menge (ca. 1,6 mg) TDSME und von Mal zu Mal steigende Mengen (0,7-10 mg) MVLTMS genau eingewogen und mit wasserfreiem Pyridin von ZT zur Marke aufgefüllt. Je drei 50-µl-Aliquote dieser Mischungen wurden in den Gaschromatographen injiziert. Nach der Methode "Halbwertsbreite mal Höhe" wurden die Flächen der Gipfel im Gaschromatogramm bestimmt und daraus sowie aus den Wägeergebnissen wurde nach G. 21 (S. 68) jeweils der Faktor f berechnet. Aus den Ergebnissen dreier Parallelbestimmungen an einer Eichlösung wurde jeweils ein Mittelwert für f und für F_{MVLTMS} gebildet und über G_{MVLTMS} aufgetragen. So ergaben sich die beiden Kurven in Abb. 47, S. 69.

i) Bestimmung der Zählausbeute für ^{14}C in der Durchfluß-Szintillationszelle

In den Gaschromatographen, an den die Radiogaschromatographie-Einrichtung angeschlossen war, wurden steigende Mengen (2,5-10 µl) eines [1-^{14}C]-n-Hexadecan-Eichpräparates (ohne Lösungsmittel) bekannter spezifischer Radioaktivität injiziert und Massen- und Radioaktivitätsdiagramm aufgenommen. Die Massengipfel ließen sich wegen ihrer Unsymmetrie zuweilen nicht nach der Dreiecksflächen-Methode auswerten und wurden dann ausgeschnitten und gewogen. Die der Masse entsprechende Größe (Gipfelfläche oder Papiergewicht) wurde über dem Injektionsvolumen aufgetragen. Die Meßpunkte lagen stets auf einer Ursprungsgeraden. Damit war sichergestellt, daß bis zur Massendetektion nicht irgendwo eine konstante Menge Hexadecan verloren ging. Die Radioaktivitätsgipfel wurden digital integriert, die Untergrundimpulse im Integrationszeitraum abgezogen und so die dem Gipfel entsprechende Nettoimpulszahl I erhalten. Ferner wurde während der Registrierung des Gipfels dreimal die Gasdurchfluß-Geschwindigkeit 60 V_S/t_S (Seifenblasenströmungsmesser) bestimmt und gemittelt.

Sodann wurde I mit dem Verhältnis aus Durchfluß-Geschwindigkeit und freiem Gasvolumen V_Z der Zählzelle, also mit 60 $V_S/(t_S\ V_Z)$ multipliziert und die erhaltenen Impulswerte für stationären Zählvorgang über den zugehörigen Injektionsvolumina aufgetragen. Die Punkte lagen erneut auf einer Geraden. Aus deren Steigung a (Ipm/µl ^{14}C-Hexadecan) wurde nach folgender Formel die Zählausbeute (als Bruchteil von 1) berechnet:

$$z = \frac{4{,}5 \cdot 10^{-4} a}{d_{HD} \cdot s} \qquad (25)$$

a	Geradensteigung $min^{-1}\ \mu l^{-1}$
$4{,}5 \cdot 10^{-4}$	Umrechnungsfaktor $min\ \mu C\ \mu l\ ml^{-1}$
d_{HD}	Dichte des Hexadecans (0,775 $g\ ml^{-1}$ bei 20°C)
s	spez. Radioaktivität des Hexadecans µC/g

Wegen der Bedeutung der Größen z, V_S, t_S, V_Z und des Umrechnungsfaktors 60 sei auch auf S. 70 verwiesen. Bei einem Gesamtvolumen einer Zählzelle von 8 ml betrug das freie Gasvolumen – je nach Dichte der Anthracenpackung – 5,2 bis 5,8 ml. Demgemäß wurden Zählausbeuten zwischen 0,47 und 0,53 gefunden.

j) ALGOL-Programm

In Abb. 62a-d wird das zur Auswertung der Analysendaten verwendete ALGOL-Programm wiedergegeben.

```
ALGOR TR4 (2)     MV 9 / JAN 67 /  MODE  2
'BEGIN'
'COMMENT'
VERSUCH LAB.J.S.886
TMS-AGENS LAB .J .S .884
;
'INTEGER' I,R,S,T,J,V,W,K,N,D,E,F,G,L,M;
'REAL'NENNER,ZAEHLER,DENOM,NUM,CMVA,VOLCAR,MVLTMS,VTDSME,VGES,ATDSME,
ZAB,GTDSME,VINJ,SRAHMG,VZZELL,VTMS,VINK,COHMG,  UMH,PINCH,ARG,UMR,
SUMA,SUMB,SUMC,SUMD,NUMERA,NUMERB,DENOMI,A,B,KM,YGROSS,CONST,ATMVL,
STEIG,SLOPE,ABSCHN;
'BOOLEAN'PROTEIN,ZEIT,SUBSTRAT;
'REAL''PROCEDURE'LN(X);'VALUE'X;
'REAL'X;'CODE';
READ(CMVA,VOLCAR,MVLTMS,VTDSME,VGES,ATDSME,ZAB,GTDSME,VINJ,SRAHMG,
VZZELL,VTMS,VINK,COHMG,UMH,UMR,PINCH,ATMVL,STEIG,SLOPE,ABSCHN);
READ(N);
ZAEHLER:=CMVA*VOLCAR*VTDSME*60*ATDSME*VGES*MVLTMS;
NENNER:=ZAB*GTDSME*VINJ*SRAHMG*ATMVL*VTMS*VZZELL;
CONST:=ZAEHLER/NENNER;
'BEGIN'
'ARRAY'GESIM,UIM,TGESIM,TUIM,VSEIF,HTDSME,BTDSME,VEADD,VHMG,HMVLTM,
BMVLTM,TSEIF,EKONZ,THEAK,FMVLTM,GMVLTM,FEICH,CONHMG,AKTENZ,AKTDRIT,
DRIT,AKTEM,TEMDRIT,ORD,UMS,ORDRIT,SREZ,SPAREZ,SPADRIT,
SPEZAK,EINK[1:N];
READ(GESIM,UIM,TGESIM,TUIM,VSEIF,HTDSME,BTDSME,VEADD,VHMG,
HMVLTM,BMVLTM,TSEIF,EKONZ,THEAK);
'FOR'I:=1'STEP'1'UNTIL'N'DO'
'BEGIN'
FMVLTM[I]:=ATMVL*BMVLTM[I]*HMVLTM[I]*UMH/(PINCH*UMR);
GMVLTM[I]:=FMVLTM[I]/STEIG
'COMMENT'BERECHNUNG DES EICHFAKTORS;
'COMMENT'
EICHDIAGRAMM LAB J S
859 A;
'IF'GMVLTM[I]'NOTLESS'40'THEN'
FEICH[I]:=SLOPE*GMVLTM[I]+ABSCHN
'ELSE'FEICH[I]:=0;
'COMMENT'  ENDE BERECHNUNG DES EICHFAKTORS ;
EINK[I]:=VEADD[I]*EKONZ[I]/VINK;
CONHMG[I]:=COHMG*VHMG[I]/VINK;
'COMMENT' BERECHNUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITAET;
NUM:=(GESIM[I]-UIM[I])*TGESIM[I]/TUIM[I])*VSEIF[I]*HTDSME[I]
*BTDSME[I];
DENOM:=FEICH[I]*HMVLTM[I]*TSEIF[I]*EKONZ[I]*VEADD[I]
*THEAK[I]*BMVLTM[I];
'IF'DENOM'EQUAL'0'THEN''BEGIN'SPEZAK[I]:=0;'GOTO'BAD;'END';
SPEZAK[I]:=CONST*NUM/DENOM;
BAD:
'END' SPEZIFISCHE AKTIVITAET;
'FOR'I:=1'STEP'3'UNTIL'N'DO'
'BEGIN'
K:=(I-1)/3+1;
DRIT[K]:=(SPEZAK[I]+SPEZAK[I+1]+SPEZAK[I+2])/3;
'END' MITTELWERTBILDUNG AUS JE DREI WERTEN DER SPEZ .AKTIVITAET;
'COMMENT' ENZYM-,ZEIT-,SUBSTRATABHAENGIGKEIT;
READ(PROTEIN,ZEIT,SUBSTRAT);
READ(R,S);
```

Abb. 62a

```
L:=R; M:=S;
'IF' ZEIT 'THEN'
'BEGIN'
READ(T,U);
'IF' T 'LESS' L 'OR' L 'EQUAL' 0 'THEN' L:=T;
'IF' U 'GREATER' M 'OR' M 'EQUAL' 0 'THEN' M:=U;
'END';
'IF' SUBSTRAT 'THEN'
'BEGIN'
READ(V,W);
'IF' V 'LESS' L 'OR' L 'EQUAL' 0 'THEN' L:=V;
'IF' W 'GREATER' M 'OR' M 'EQUAL' 0 'THEN' M:=W;
'END';
'IF' PROTEIN 'OR' ZEIT 'OR' SUBSTRAT 'THEN'
'BEGIN'
'FOR' I:=L 'STEP'1 'UNTIL' M 'DO'
'BEGIN'
AKTENZ[I]:=SPEZAK[I]*EINK[I];
'END';
'FOR' I:=L 'STEP'3 'UNTIL' M 'DO'
'BEGIN'
K:=(I-1)/3+1;
AKTDRIT[K]:=(AKTENZ[I]+AKTENZ[I+1]+AKTENZ[I+2])/3;
'END' DRITTELUNG;
'END';
'COMMENT' ZEITABHAENGIGKEIT;
'IF'ZEIT'THEN'
'BEGIN'
'FOR'I:=T'STEP'1'UNTIL'U'DO'
'BEGIN'
AKTEM[I]:=SPEZAK[I]*TREAK[I];
ARG:=CONHMG[I]/(CONHMG[I]-AKTENZ[I]);
ORD[I]:=1/TREAK[I]*LN(ARG);
UMS[I]:=100*AKTENZ[I]/CONHMG[I];
'END';
'FOR'I:=T'STEP'3'UNTIL'U'DO'
'BEGIN'
K:=(I-1)/3+1;
TEMDRIT[K]:=(AKTEM[I]+AKTEM[I+1]+AKTEM[I+2])/3;
ORDDRIT[K]:=(ORD[I]+ORD[I+1]+ORD[I+2])/3;
'END' INTEGRIERTE MICHAELISGLEICHUNG UND MITTELUNG;
'END' ZEITABHAENGIGKEIT;
'COMMENT' SUBSTRATABHAENGIGKEIT;
'IF'SUBSTRAT'THEN'
'BEGIN'
SUMA:=SUMB:=SUMC:=SUMD:=0;
'FOR'I:=V'STEP'1'UNTIL'W'DO'
'BEGIN'
SREZ[I]:=1/CONHMG[I];
SUMA:=SUMA+SREZ[I];
SPAREZ[I]:=1/SPEZAK[I];SUMB:=SUMB+SPAREZ[I];
SUMC:=SUMC+SREZ[I]*SPAREZ[I];
SUMD:=SUMD+SREZ[I]*SREZ[I];
ARG:=CONHMG[I]/(CONHMG[I]-AKTENZ[I]);
ORD[I]:=LN(ARG)/TREAK[I];
UMS[I]:=100*AKTENZ[I]/CONHMG[I];
'END' INTEGRIERTE MICHAELISGLEICHUNG;
'FOR'I:=V'STEP'3'UNTIL'W'DO'
'BEGIN'
K:=(I-1)/3+1;
SPADRIT[K]:=(SPAREZ[I]+SPAREZ[I+1]+SPAREZ[I+2])/3;
ORDDRIT[K]:=(ORD[I]+ORD[I+1]+ORD[I+2])/3;
```

Abb. 62b

```
'END' DRITTELUNG;
DENOMI:=SUMA*SUMA-(W-V+1)*SUMD;
NUMERA:=SUMA*SUMB-(W-V+1)*SUMC;
NUMERB:=SUMA*SUMC-SUMB*SUMD;
A:=NUMERA/DENOMI;
B:=NUMERB/DENOMI;
KM:=-B/A;   YGROSS:=A*SREZ[V1+B;
'END' SUBSTRATABHAENGIGKEIT;
'COMMENT' ENDE ENZYM-,ZEIT-,SUBSTRATABHAENGIGKEIT ;
D:=0;
OUTPUT(2,'('*'('CMVA(UMOL/ML)  VOLCAR(ML)  MVLTMS(UG/UMOL)  ')',
'('VTDSME(UL)  VGES(UL)  ATDSME  ZAB  GTDSME(UG)  VINJ(UL)')',
/3B-ZD.2D,8B-D.3D,7B-ZDD.2D,8B-4ZD,7B-ZZD,5B-ZD,2B-D.2D,
4B-4ZD,5B-ZD,')',CMVA,VOLCAR,MVLTMS,VTDSME,VGES,ATDSME,ZAB,GTDSME,
VINJ);
OUTPUT(2,'('//////,'('SRAHMG(1/UMOL/MIN)  VZZELL(ML)  VTMS(UL)')',
'('  UMH(MV/CM)  UMR(CM/INCH)  PINCH(INCH/MIN)  VINK(ML)')',
'('  COHMG(UMOL/ML)')',/,3B-D.DDB'+D,9B-D.2D,6B-ZZD,6B-D.4D,
7B-D.2D,10B,-D.4D,8B-D.3D,6B-D.2D')',SRAHMG,VZZELL,VTMS,UMH,UMR,
PINCH,VINK,COHMG);
REP:
OUTPUT(2,'('*'('  N  EKONZ(MG/ML)  VEADD(ML)  EINK(MG/ML)  ')',
'('CONHMG(UMOL/ML)  TREAK(H)  ATDSME  HTDSME(CM)')',/,')');
D:=D+1;
E:=(D-1)*50+1;
F:=0;
'FOR'I:=E'STEP'1'UNTIL'N'DO'
'BEGIN'
F:=F+1;
OUTPUT(2,'('/ZZD,3B-ZD.D,9B-D.3D,')',I,EKONZ[I],VEADD[I]);
OUTPUT(2,'('6B-D.2D,')',EINK[I]);
OUTPUT(2,'('9B-D.3D,11B-D.2D,4B-ZD,5B-ZD.D,')',CONHMG[I],TREAK[I],
ATDSME,HTDSME[I]);
'IF'F'GREATER'49'THEN'
'GOTO'REP;
'END';
D:=0;
RED:
OUTPUT(2,'('*'('  N  BTDSME(CM)  ATMVL  HMVLTM(CM)  BMVLTM(CM)')',
'('  FMVL M(MV-MIN)  GMVLTM(UG)  FEICH  GESIM  TGESIM(MIN)')',/,')');
D:=D+1;E:=(D-1)*50+1;F:=0;
'FOR'I:=E'STEP'1'UNTIL'N'DO'
'BEGIN'
F:=F+1;
OUTPUT(2,'('/ZZD,4B-D.2D,6B-ZD,4B-ZD.D,7B-D.2D,7B-D.2D,11B-ZZD,7B-D.2D,
2B-5ZD,5B-D.2D,')',I,BTDSME[I],ATMVL,HMVLTM[I],BMVLTM[I],
FMVLTM[I],
GMVLTM[I],FEICH[I],GESIM[I],TGESIM[I]);
'IF'F'GREATER'49'THEN''GOTO'RED;
'END';
D:=0;G:=1;
REF:
OUTPUT(2,'('*'('  N  UIM  TUIM(MIN)  VSEIF(ML)  TSEIF(SEC) ')',
'('SPEZAK(UMOL/MG/H)  DRI[(UMOL/MG/H)')',/,')');
D:=D+1;
E:=(D-1)*45+1;
F:=0;
'FOR'I:=E'STEP'1'UNTIL'N'DO'
'BEGIN'
F:=F+1;
OUTPUT(2,'('/ZZD,  -4ZD,5B-D.2D,6B-ZD,D,6B-ZD,D,9B-D.5D,')',I,UIM[I],
TUIM[I],VSEIF[I],TSEIF[I],SPEZAK[I]);
```

Abb. 62c

```
'IF'I'EQUAL'3*G'THEN'
'BEGIN'
OUTPUT(2,'('9B-D.5D/')',DRIT[G]);
G:=G+1;
'END';
'IF'F'GREATER'44'THEN''GOTO'REF
'END';
'IF'PROTEIN'THEN'
'BEGIN'
G:=(R+2)/3;
OUTPUT(2,'('*'(' N EINK(MG/ML) AKTENZ(UMOL/ML/H) ')',
'('MITTELWERT')',/,')');
'FOR'I:=R'STEP'3'UNTIL'S'DO'
'BEGIN'
OUTPUT(2,'('/ZZD,3B-D.2D,6B-D.5D,')',I,EINK[I],AKTENZ[I]);
'IF'I'EQUAL'3*G'THEN'
'BEGIN'
OUTPUT(2,'('11B-D.5D/')',AKTDRIT[G]);
G:=G+1;
'END';
'END';'END'PROTEIN;
'IF'ZEIT'THEN''BEGIN'
G:=(T+2)/3;
OUTPUT(2,'('*'(' N TREAK(H) AKTEM(UMOL/MG) MITTELWERT')',
'('CONHMG(UMOL/ML) UMS(0/0) ORD(1/H) ORDINATENMITTEL')',/,')');
'FOR'I:=T'STEP'1'UNTIL'U'DO'
'BEGIN'
OUTPUT(2,'('/ZZD,3B-D.2D,3B-D,5D,')',I,TREAK[I],AKTEM[I]);
'IF'I'EQUAL'3*G'THEN'OUTPUT(2,'('9B-D.5D,')',TEMDRIT[G])
'ELSE'
OUTPUT(2,'('17B,')');
OUTPUT(2,'('6B-D.4D,5B-ZD.D,3B-4ZD.6D,')',CONHMG[I],UMS[I],
ORD[I]);
'IF'I'EQUAL'3*G'THEN'
'BEGIN'
OUTPUT(2,'('2B-4ZD.6D/')',ORDRIT[G]);
G:=G+1;
'END';
'END';'END' ZEIT;
'IF'SUBSTRAT'THEN'
'BEGIN'
G:=(V+2)/3;
OUTPUT(2,'('*'(' N VHMG(ML) CONHMG(UMOL/ML) SPEZAK(UMOL/MG/H)')',
'(' UMS(0/0) SREZ(ML/UMOL) SPAREZ(MG*H/UMOL) MITSPAREZ ORD(1/H) ')',
'(' ORDMIT')',/,')');
'FOR'I:=V'STER'1'UNTIL'W'DO'
'BEGIN'
OUTPUT(2,'('/ZZD,2B-D.4D,5B-D,4D,11B-D,5D,8B-ZD.D,5B-2ZD.D,
   11B-4ZD.D,')',I,VHMG[I],CONHMG[I],SPEZAK[I],UMS[I],
SREZ[I],SPAREZ[I]);
'IF'I'EQUAL'3*G'THEN'
OUTPUT(2,'('5B-4ZD.D,')',SPADRIT[G])
'ELSE'OUTPUT(2,'('13B,')');
OUTPUT(2,'('B-3ZD.3D,')',ORD[I]);
'IF'I'EQUAL'3*G'THEN'
'BEGIN'
OUTPUT(2,'('B-3ZD,3D/')',ORDRIT[G]);
G:=G+1;
'END';
'END';
OUTPUT(2,'('*5/7B'('A')',13B'('B')',12B'('KM')',10B'('YGROSS')',')');
OUTPUT(2,'('/8B-5ZD,3D,3B-5ZD,3D,3B-5ZD,3D,3B-5ZD,3D')',A,B,KM,YGROSS);


'END'SUBSTRAT;
'END';
'END';
```

Abb. 62d

7. Zu Kapitel V (Eigenschaften der membrangebundenen HMG-CoA-Reduktase)

a) Test auf microsomale HMG-CoA-Lyase

Es wurden gemischt: 0,200 ml 1 M Tris/HCl, pH 8.0; 0,100 ml 0,1 M $MgCl_2$; 0,010 ml 0,35 M Glutathion (neutralisiert); 0,200 ml Microsomensuspension (10 mg Protein/ml); 0,268 ml H_2O. Durch Zugabe von 0,050 ml 4,4 mM HMG-CoA wurde die Reaktion gestartet. Variation der Volumina der Ingredientien geschah auf Kosten der Wassermenge. Inkubation 30 min, 37^0. Nach Einstellen in ein Eisbad wurde die Reaktion mit 0,172 ml 1,68 M (22^0) Trichloressigsäure beendet. Das ausgeflockte Protein wurde in einer gekühlten Tischzentrifuge hochtourig sedimentiert. 0,5 ml des Überstandes wurden mit 0,5 ml 1 M Na-Acetat gepuffert und mit dem frisch bereiteten Diazoreagens versetzt. Im übrigen wurde verfahren, wie von Walker (136) beschrieben. Zur Eichung der Methode wurde eine Standard-Acetacetatlösung (191) hergestellt. Deren manometrische Konzentrationsbestimmung nach Edson (192) ist wesentlich unempfindlicher und ungenauer als die mittels optischem Test mit D(-)-β-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (193), weswegen die enzymatische Methode vorgezogen wurde.

b) Jodacetamidhemmung (Abb. 55,S. 83)

0,39 ml Microsomensuspension (16,9 mg Protein/ml) wurden mit 0,070 ml 0,04 M K-Phosphatpuffer, pH 7.2, und 0,100 ml wäßriger $5,6 \cdot 10^{-x}$ bzw. $2,8 \cdot 10^{-x}$ M JAA-Lösung versetzt, um 0,560 ml einer $1 \cdot 10^{-x}$ bzw. $0,5 \cdot 10^{-x}$ M JAA-Lösung zu erhalten. Diese Mischung wurde 15 min bei 25^0 inkubiert und die Reaktion durch Zusatz von 0,100 ml 0,1 M Cystein in 0,04 M Homogenisationsmedium, pH 7.2, angehalten. Die Pufferkapazität war auch bei der konzentriertesten der JAA-Lösungen ausreichend, damit das pH sich durch Cystein-Zusatz nicht veränderte. 0,040 ml dieser vorinkubierten Microsomenpräparate wurde wie üblich (S.131) in den HMG-Reduktase-Test eingesetzt.

Zu Tab. 8, S. 83. Von drei Proben à 0,111 ml Microsomensuspension (16,9 mg Protein/ml) wurden Proben 1 und 2 mit je 0,020 ml einer ^{14}C-HMG-CoA-Lösung (1,2 µMol/ml), Probe 3 mit 0,020 ml 0,04 M K-Phosphatpuffer (Homogenisationsmedium), pH 7.2, 15 min lang bei 25^0 inkubiert. Dann wurden Proben 2 und 3 0,028 ml $5,6 \cdot 10^{-3}$ M JAA-Lösung zugesetzt, Probe 3 aber 0,028 ml Puffer, weitere 15 min inkubiert und schließ-

lich nach Zusatz von 0,029 ml 0,1 M Cysteinlösung in 0,04 M Puffer (s.o.) zu allen drei Proben die Inkubation beendet. 0,04 ml der erhaltenen Mischungen wurden in den Reduktase-Test eingesetzt. Die Bezeichnung der Proben folgt der 1. Spalte der Tabelle.

c) Untersuchungen zum Fasteneffekt

Cholesterolsuspension. Die Suspension wurde nach dem Verfahren von Day et al. (141) bereitet. Nach dem langsamen Eintropfen der acetonischen Cholesterol-Lösung in Wasser wurden gröbere Teilchen durch Abnutschen entfernt (häufiger Filterwechsel nötig). Bestimmung des Gehaltes der über viele Monate stabilen milchigen Suspension durch das Trockengewicht.

Microsomenextrakte. Die Lebermicrosomen (106 mg Protein) einer normal ernährten Ratte (286 g) und zweier Fastentiere (24 h Fasten; 244 und 265 g Körpergewicht; 317 mg Microsomenprotein) wurden lyophilisiert. Dann wurden sie mit je 50 ml einer Mischung aus 2 Volumteilen $CHCl_3$ und einem Teil Methanol 24 h bei 4^0 gerührt, Unlösliches abfiltriert und die Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Extrakt aus "normalen" Microsomen wurde in 0,2 ml 0,2 M EDTA, pH 7.2, der aus "Fastenmirosomen" in 0,6 ml 0,07 M EDTA emulgiert. Es entstanden stabile milchige Emulsionen. Pro Inkubation wurden 0,05 ml einer Suspension zugesetzt.

Kohomogenisation der Lebern normaler und gefasteter Tiere

8 ungefähr gleich schwere Ratten wurden in 2 gleich große Gruppen unterteilt. Die einen wurden normal weitergefüttert; die anderen 25 h gehungert. Dann wurden alle Tiere gewogen und geschlachtet und die Gewichte ihrer Lebern bestimmt (Tab. 23).

Sämtliche Lebern wurden halbiert und je ½ Leber folgender Ratten miteinander homogenisiert (2 Volumina Homogenisationsmedium (61)/g Leber): 1) Ratten 1-4; 2) Ratten 5-8; 3) Ratten 1,2,5,6; 4) Ratten 3,4,7,8. Die beiden letzten Homogenate wurden vereinigt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie beschrieben (61).

Tabelle 23

Ratte Nr.	Behandlung	Gewicht g		
		Körper		Leber
		vor Beginn der Fastenperiode	vor dem Schlachten	
1	normal ernährt	103	109	4,9
2	" "	89	94	4,5
3	" "	103	110	4,8
4	" "	112	121	5,4
5	gefastet	107	93	3,3
6	"	109	99	3,3
7	"	107	97	3,3
8	"	90	80	2,9

d) Stabilität

Die Homogenisationspuffer enthielten: 0,1 M Rohrzucker, 0,05 M KCl, 0,04 M K-Phosphat. Die pH-Werte 6.5; 7.0 und 7.5 wurden bei 0^0 eingestellt. Je 3 Lebern der zwischen 91 und 116 g wiegenden Ratten wurden mit einem der Puffer homogenisiert (61). Nach Zentrifugation bei 10 000 g, 10 min, wurden die pH-Werte der Überstände, die sich maximal um 0.1 Einheiten gegenüber denen der Puffer verändert hatten, nachgestellt. Die Microsomen wurden dann wie beschrieben (61) isoliert; zu ihrer Rehomogenisation wurden lediglich die entsprechenden Homogenisationspuffer verwendet. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (189) wurde auf 10 mg/ml mit Puffer verdünnt und dann die Inkubationen bei 0^0 und 25^0 begonnen. Seit dem Schlachten der Tiere waren zu diesem Zeitpunkt 6 h vergangen.

e) Versuch zur Ablösung der Microsomen

Mit 6 Ratten (Körpergewichte 140-168 g) wurde der Versuch ausgeführt, wie von Linn (119) beschrieben. Das verwendete Aceton war zuvor 24 h über $KMnO_4$ gekocht und dann destilliert worden. Der Äther zur Trocknung des Acetonpulvers war mit $LiAlH_4$ ca. 12 h gekocht und kurz vor seiner Verwendung im Dunkeln destilliert worden. Die Herstellung des Acetonpulvers wurde in 3 Chargen vorgenommen. Ca. 15 ml Puffer

wurden zur Elution verwendet, um eine konzentrierte Enzymlösung zu erhalten. Trotz vorsichtigem Rühren löste sich offensichtlich nur sehr wenig Protein, so daß die groben Partikel durch niedertouriges Zentrifugieren entfernt werden mußten. Der trübe Überstand, als Acetonpulver-Suspension bezeichnet, wurde 90 min bei 105 000 g zentrifugiert. Der Proteingehalt des erhaltenen gelblich gefärbten klaren Überstandes (105 000-g-Überstand) wurde nach Warburg und Christian (194) bestimmt, der der Microsomen- und Acetonpulver-Suspension mit der Biuretmethode (189).

f) Angaben zu einzelnen Versuchen

Zu Abb. 50, S. 75.

	Inkubationsvolumen ml	HMG-CoA-Konzentration µM
Kurve I	0,5	60
Kurve II	0,2	75
Kurve III	0,2	75

Im übrigen Standardbedingungen (S. 131).

Zu Abb. 51, S. 76. Proteinkonzentration bei allen 3 Versuchen 2 mg/ml. Inkubationsvolumen: Kurve I 0,5 ml, Kurven II und III 0,2 ml. Sonst Standardbedingungen (S. 131).

Zu Abb. 52, S. 77. Proteinkonzentration in allen Fällen 2 mg/ml. Im übrigen Standardbedingungen S. 131).

Zu Tab. 6 S. 81. Außer den – wie im Standardtest (S. 131) üblich – etliche h vor Beginn der Inkubation vorgemischten Ingredientien wurde bei Versuch 2 ausnahmsweise auch Cystein bereits dieser Vormischung beigefügt und die Proben bei 4^0 aufbewahrt.

Zu Tab. 7, S. 82. Die wäßrigen Lösungen der Reduktionsmittel wurden kurz vor dem Start der Inkubationen hergestellt und den Inkubationsgemischen zugefügt.

8. Zu Kapitel VI (Wirkung von Gallensäuren auf die HMG-CoA-Reduktase)

a) Reinheitsprüfung von Gallensäuren

Die nichtkonjugierten Gallensäuren Cholsäure, DOC, CDOC wurden mittels Dünnschichtchromatographie nach Eneroth (195), Fließmittel S 11, auf Reinheit geprüft. Aufgetragen wurden etwa 10 µg/Fleck auf Platten 20 X 20 cm^2, Laufstrecke 15 cm, 40 min, 25°. Sichtbarmachen der Flecke mit Phosphomolybdat (196). Die konjugierten Gallensäuren wurden analog mit dem Lösungsmittel II nach Hofmann (196) entwickelt. Laufzeit 2 h. Sonst wie oben.

b) Darstellung der konjugierten Gallensäuren

Die Darstellung folgte im Prinzip den Vorschriften von Norman (197), wurde jedoch in einigen wesentlichen Punkten abgeändert.

Na-TCDOC. 393 mg (1,0 mMol) Chenodesoxycholsäure und 0,246 ml (1,0 mMol) Tri-n-butylamin (über KOH aufbewahrt) in 4 ml Dioxan (über Na) unter leichtem Erwärmen gelöst, wurden zunächst bei 10° mit 0,099 ml (1,0 mMol) Chlorameisensäureäthylester und nach Ablauf von 15 min mit einer Lösung von 144 mg (1,14 mMol) Taurin in 1,18 ml 0,975 N NaOH unter heftigem Rühren versetzt. Nach weiteren 60 min wurde mit NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert, im Vakuum eingedampft, mit einigen ml 1 N NaOH aufgenommen, die Base dreimal mit 4-5 Vol. Äther ausgeschüttelt und die ätherische Phase verworfen. Nach Ansäuern der wäßrigen Phase auf ca. pH 1 wurde dreimal mit je 20 ml n-Butanol extrahiert; Phasentrennung durch Zentrifugation und Dekantation. Die vereinigten Butanolextrakte wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, wobei eine leicht gelblich gefärbte zähe Masse zurückblieb. Es hatte sich gezeigt, daß hierdurch Tri-n-butylamin nicht vollständig zu entfernen ist. Wird es nicht eliminiert, so läßt sich die konjugierte Gallensäure bei der folgenden Säulenchromatographie mit vertauschten Phasen (198) kaum mehr eluieren. Deshalb wurde der Rückstand (s.o.) in möglichst wenig Wasser auf eine Säule von Dowex 50 X 2, H^+-Form, 100 X 8 mm, gegeben und mit Wasser eluiert. Die ersten 60 ml Eluat enthielten sämtliche Gallensäuren. Sie wurden im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 3 ml n-Butanol-gesättigtem Wasser (25°) gelöst und auf eine Säule mit hydrophober Kieselgur gegeben (198). Zu deren Herstellung wurden zweimal 10 g hydrophobe Kieselgur mit jeweils 8,9 ml wassergesättigtem (bei 25°) n-Butanol homogen verrührt, in bei 25° mit butanolgesättigtem Wasser suspendiert, in eine

Säule von 2,2 cm Durchmesser eingefüllt. Füllhöhe ca. 10cm.

Herstellung der Phasen, Säulenfüllung und Elution müssen unbedingt bei konstanter Temperatur durchgeführt werden, da sonst Entmischung stattfindet. Die Säule wurde mit einer Schicht aus Quarzsand abgedeckt. Nach Aufsetzen der Gallensäurelösung (s.o.) wurde unter dem Druck von ca. 1,5 m Wassersäule mit butanolgesättigtem Wasser eluiert und Fraktionen von ca. 15 ml aufgefangen. Aliquote wurden mit ca. N/100 NaOH unter N_2 gegen Phenolphthalein titriert. Abb. 63 zeigt das Elutionsdiagramm. Die Fraktionen zwischen 36 und 245 ml wurden vereinigt, im Vakuum eingedampft, in 2 ml H_2O gelöst, mit 1 N NaOH neutralisiert, erneut eingedampft, in heißem 99%igem Äthanol gelöst, durch Zusatz von Äthylacetat ausgefällt, der Niederschlag abzentrifugiert, mit wenig Alkohol : Äther = 1 : 1, dann nur mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. 4 Fraktionen von insgesamt 126 mg wurden erhalten, deren Freiheit von CDOC mittels Dünnschichtchromatographie belegt wurde.

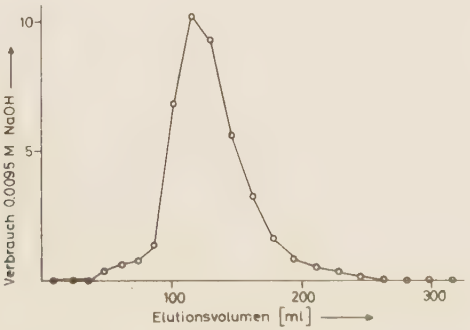


Abbildung 63

Reinigung von Taurochenodesoxycholsäure durch Chromatographie mittels vertauschter Phasen

Na-TC und Na-TDOC wurden analog Na-TCDOC hergestellt. Es wurden also – abweichend von der Normanschen Vorschrift (197) – auch diese Salze über Dowex und Chromatographie mit vertauschten Phasen gereinigt, bevor sie durch organische Lösungsmittel gefällt wurden. Reinheitsprüfung ergab, daß keine Begleitsubstanzen vorhanden waren.

Die Reinigung von Hyflo Super Cel (Kieselgur) wurde im Prinzip nach Howard und Martin (199) ausgeführt.

c) Inkubation der Reduktase mit Gallensäuren

Die diversen Gallensäuren wurden bereits der Vormischung (siehe S.131) zugegeben, CDOC als freie Säure, alle anderen als Na-Salze. Die Inkubationen wurden auch hier durch Microsomenzusatz gestartet. Cholat, TC, CDOC wurden in 10^{-3} M Lösung auf ihre Wirkung auf Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase untersucht (200). Sie beeinträchtigten die Aktivität des Enzyms nicht.

d) Waschversuche an Microsomen

Die durch Zentrifugation der 10000-g-Überstände der Rattenleber-Homogenate bei 105 000 g erhaltenen Microsomenschichten wurden in soviel Homogenisationspuffer (61) resuspendiert, daß die Proteinkonzentration 10,0 mg/ml bei normalen Microsomen und 7,5 mg/ml bei Fastenmicrosomen betrug. In den folgenden Zentrifugationen bei 105 000g (1 h) wurden gemessene Volumina der Suspensionen von 13-15 ml pro Zentrifugenröhrchen eingesetzt. Die Microsomen waren zuvor in den um 0,5-1 ml (gemessen) größeren Puffervolumina resuspendiert worden (also 13,5-15,5 ml); Diese überschüssigen 0,5-1 ml Microsomen wurden für Protein- und Aktivitätsbestimmungen abgezweigt. Selbstverständlich wurden die in Tab. 20, S.100, aufgeführten Werte erhalten, indem dieser Entzug von Microsomen aus dem Waschvorgang rechnerisch berücksichtigt wurde. Zur letzten Resuspension wurde nur soviel Puffer verwendet, daß Endvolumina von 10 ml resultierten.

IX. Zusammenfassung

Die Aktivität des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Cholesterolsynthese in Leber, der HMG-CoA-Reduktase, verschwindet, wenn Ratten hungern. Erst nach etwa 30-40 stündiger Wiederfütterung mit kommerzieller Volldiät wurde die ursprüngliche Aktivität wieder erreicht. Wiederfütterung mit Kohlenhydraten oder gesättigten oder ungesättigten Fetten brachte dagegen keinen, Wiederfütterung mit Protein einen geringen Aktivitätsanstieg. Mit Hilfe von Puromycin-Hemmversuchen wurden Hinweise für eine Enzyminduktion bei Wiederfütterung erhalten. Diese Vorgänge wurden durch Acetateinbau in Cholesterol an Leberschnitten verfolgt.

Als Vorarbeit für die Entwicklung eines neuen Tests zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wurden Versuche über Mevalonsäure angestellt. Neben der Kinetik der Mevalolacton-Bildung wurde das Gleichgewicht Mevalonsäure/Mevalolacton, sowie die Produkte der Wassereliminierung und der Trimethylsilierung des Lactons untersucht. Ein Verfahren zur gaschromatographischen Bestimmung des Gehaltes wäßriger Lösungen von Carbonsäuren und deren Salzen wird mitgeteilt.

Das neue Verfahren zur Bestimmung der Reduktase verläuft über Inkubation der Enzymproben mit TPNH sowie hochradioaktivem HMG-CoA, Zugabe von Trägermevalonat, Isolierung des Mevalonats als Lacton und gaschromatographische Analyse des daraus hergestellten Mevalolactontrimethylsilyläthers in Gegenwart eines inneren Standards. Zur Bestimmung kleiner HMG-CoA-Konzentrationen wurde ein verbessertes enzymatisches Verfahren ausgearbeitet.

Die HMG-CoA-Acetoacetat-Lyase-Aktivität von Microsomen wurde bestimmt. Das Enzym ist auch in Abwesenheit zweiwertiger Ionen aktiv. Die Reduktase wird durch Reduktionsmittel, insbesondere Thiolgruppen enthaltende, aktiviert und durch Jodacetamid gehemmt. Versuche mit hoher Substratkonzentration, mit dem nichtionogenen Detergens Triton WR 1339, mit Extrakten aus Microsomen, gemeinsame Inkubation von Microsomen normaler und gefasteter Ratten sowie gemeinsame Homogenisation entsprechender Lebern und Waschversuche lieferten keine Hinweise für die Gegenwart einer aktivierbaren Reduktase in Microsomen aus Fastentieren. Die Aktivität der Reduktase der Rattenleber ist nachts höher als am Tage. Die Stabilität des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten wurde geprüft. Die Aktivität nimmt anfänglich

stark zu und fällt dann wieder ab. Bei 0^0C und pH 7.0 sinkt die Aktivität in 24 h nur wenig. Ein in der Literatur angegebenes Verfahren zur Ablösung des Enzyms von den Membranen konnte nicht reproduziert werden.

Desoxycholat, Chenodesoxycholat, deren Taurinkonjugate sowie Taurocholat hemmen die Reduktase erst oberhalb Konzentrationen von 10^{-4} M nennenswert, Cholat sogar erst ab 10^{-3} M. Die Hemmung durch Taurochenodesoxycholat ist nichtkompetitiv in Bezug auf HMG-CoA. Waschversuche machten wahrscheinlich, daß sie irreversibel ist.

Es wird geschlossen, daß die Gallensäuren nicht, wie vielfach angenommen wird, auf dem Enzymniveau wirksame Feedback-Inhibitoren der Cholesterolsynthese sein können. Die Regulation der Cholesterolbiosynthese auf der Ebene des Auf- und Abbaus der HMG-CoA-Reduktase-Molekel wird als wahrscheinlich angesehen.

X. Literaturverzeichnis

1) de Fourcroy: Annales de Chimie 3, 242 (1789)

2) Windaus, A.: Z.Physiol.Chem. 67, 174 (1910)

3) Gamble, J.L., u. K.D. Blackfan: J.Biol.Chem. 42, 401 (1920)

4) Schönheimer, R.: Z.Physiol.Chem. 185, 119 (1929)

5) Dam, H.: Biochem.Z. 232, 269 (1931)

6) Sonderhoff, R., u. H. Thomas: Justus Liebigs Ann.Chem. 530, 195 (1937)

7) Rittenberg, D.R., u. R. Schönheimer: J.Biol.Chem. 121, 235 (1937)

8) Lynen, F.: Chem.Weekblad 43, 581 (1960)

9) Bloch, K.: Angew.Chem. 77, 944 (1965)

10) Popják, G., u. J.W. Cornforth: Adv. in Enzymology 22, 281 (1960)

11) Wagner, A.F., u. K. Folkers: Adv. in Enzymology 23, 471 (1961)

12) Srere, P.A., I.L. Chaikoff, S.S. Treitmann u. L.S. Burstein: J.Biol.Chem. 182, 629 (1950)

13) Hutchens, T.T., J.T. Van Bruggen, R.M. Cockburn u. E.S. West: J.Biol.Chem. 208, 115 (1954)

14) Takeuchi, N., N. Iritani, W.W. Wells u. M.P. Weserman: Biochim.Biophys.Acta 125, 375 (1966)

15) Siperstein, M.D.: Amer.J.Clin.Nutr. 8, 645 (1960)

16) Kagan, A., T.R. Dawber, W.B. Kannel u. N. Revotskie: Feder.Proc. 21, 52 (1962)

17) Gould, R.G., u. C.B. Taylor: Feder.Proc. 9, 179 (1950)

18) Tomkins, G.M., H. Sheppard u. I.L. Chaikoff: J.Biol.Chem. 201, 137 (1953)

19) Langdon, R.G., u. K. Bloch: J.Biol.Chem. 202, 77 (1953)

20) Frantz, I.D., jr., H.S. Schneider u. B.T. Hinkelman: J.Biol.Chem. 206, 465 (1954)

21) Frantz, I.D., jr., u. B.T. Hinkelman: J.Exptl.Med. 101, 225 (1955)

22) Bucher, N.L.R., K. McGarrahan, E. Gould u. A.V. Loud: J.Biol.Chem. 234, 262 (1959)

23) Sakakida, H., C.C. Shediac u. M.D. Siperstein: J.Clin.Invest. 42, 1521 (1963)

24) Bhattathiry, E.P.M., u. M.D. Siperstein: J.Clin.Invest. 42, 1613 (1963)

25) Van Bruggen, J.T., T.T. Hutchens, C.K. Claycomb, W.J. Cathey u. E.S. West: J.Biol.Chem. 196, 389 (1952)

26) Tomkins, G.M, u. I.L. Chaikoff: J.Biol.Chem. 196, 569 (1952)

27) Gould, R.G., C.B. Taylor, J.S. Hagerman, I. Warner u. D.J. Campbell: J.Biol.Chem. 201, 519 (1953)

28) Siperstein, M.D., u. M.J. Guest: J.Clin.Invest. 39, 642 (1960)

29) Lindsey, jr., C.A., u. J.D. Wilson: J.Lipid Res. 6, 173 (1965)

30) Dietschy, J.M, u. M.D. Siperstein: J.Lipid Res. 8, 97 (1967)

31) Dietschy, J.M., u. M.D. Siperstein: J.Clin.Invest.: 44, 1311 (1965)

32) Mosbach, E.H., L.L. Abell u. E. Halpern: Circulation 18, 486 (1958)

33) Beher, W.T., G.D. Baker u. W.L. Anthony: Proc. Soc. Exptl. Biol.Med. 100, 3 (1959)

34) Beher, W.T., u. G.D. Baker: Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 101, 214 (1959)

35) Beher, W.T., W.L. Anthony u. M.E. Beher: Proc.Soc.Exptl. Biol.Med. 107, 49 (1961)

36) Beher, W.T., G.D. Baker u. W.L. Anthony: Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 109, 863 (1962)

37) Back, P.: Unveröffentl.Versuche 1966

38) Myant, N.B., u. H.A. Eder: J.Lipid Res. 2, 363 (1961)

39) Bloomfield, D.K.: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 50, 117 (1963)

40) Swell, L., E.C. Trout, jr., H.Field, jr., u. C.R. Treadwell: Science 125, 1194 (1957)

41) Bucher, N.L.R., P. Overath u. F. Lynen: Biochim.Biophys.Acta 40, 491 (1960)

42) Tomkins, G.M., I.L.Chainkoff u.L.L. Bennett: J.Biol.Chem. 199, 543 (1952)

43) Hsia, T.-C., u. S.-C. Wang: Scientia Sinica 14, 874 (1965)

44) Guder, W.: Dissertation, Universität München 1967

45) Aleksandrow, D., T. Kłopotowski u. Z. Smietańska: J.Atherosclerosis Res. 4, 351 (1964)

46) Nakamura, H.: Radioisotopes (Tokyo) 13, 217 (1964)

47) Migicovsky, B.B., u. J.D. Wood: Canad.J.Biochem.Physiol. 33, 135 (1955)

48) Migicovsky, B.B.: Canad.J.Biochem.Physiol. 39, 747 (1961)

49) Migicovsky, B.B.: Canad.J.Biochem.Physiol. 42, 105 (1964)

50) Migicovsky, B.B.: Feder.Proc. 24, 660 (1965)

51) Siperstein, M.D., u. V.M. Fagan: Feder.Proc. 21, 300 (1962)

52) Siperstein, M.D., u. V.M. Fagan: J.Biol.Chem. 241, 602 (1966)

53) Siperstein, M.D., u. V.M. Fagan: Adv. Enzyme Regul. 2, 249 (1964)

54) Fimognari, G.M.: Dissertaiton, San Francisco 1964

55) Fimognari, G.M, u.V.W. Rodwell: Science 147, 1038 (1965)

56) Fimognari, G.M., u.V.W.Rodwell: Biochemistry 4, 2086 (1965)

57) Knappe, J., E. Ringelmann u. F. Lynen: Biochem.Z. 332, 195 (1959)

58) Ogilvie, J.W., u. B.H. Kaplan: J.Biol.Chem. 241, 4722 (1966)

59) Fredrickson, D.S., A.V. Loud, B.T. Hinkelman u. H.S. Schneider: J.Exptl.Med. 99, 43 (1954)

60) Kattermann, R., W. Reutter u. K. Decker: Klin.Wschr. 43, 393 (1965)

61) Regen, D.M., C. Riepertinger, B. Hamprecht u. F. Lynen: Biochem.Z. 346, 78 (1966)

62) Bloch, K., E. Borek u.D. Rittenberg: J.Biol.Chem. 162, 441 (1946)

63) Bucher, N.L.R., u. K. McGarrahan: J.Biol.Chem. 222, 1 (1956)

64) Siperstein, M.D., V.M.Fagan u. J.M. Dietschy: J.Biol.Chem. 241, 597 (1966)

65) Krebs, H.A., u. K. Henseleit: Z.Physiol.Chem. 210,33 (1932)

66) v. Danckelman, J.: persönliche Mitteilung

67) Thomson, R.Y., F.C. Heagy, W.C. Hutchison u. J.N. Davidson: Biochem.J. 53, 460 (1953)

68) Schneider, W.C., in S.P. Colowick u. N.O. Kaplan: Methods in Enzymology III, S. 680, Academic Press, New York 1957

69) Roseman, R.H., u. E. Shibata: Proc. Soc.Exptl.Biol.Med. 81, 296 (1952)

70) Givner, M.L., u. D. Dvornik: Biochem.Pharmacol. 14, 611 (1965)

71) Dayton, S.: Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 108, 257 (1961)

72) Catravas, G.N., u. H.S. Anker: J.Biol.Chem. 232, 669 (1958)

73) Brüggemann, J., K. Drepper u. H. Zucker, in H.M. Rauen: Biochem. Taschenbuch, Bd. II, S. 273 und 278, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964

74) Cremer, H.D., in H.M. Rauen: Biochem. Taschenbuch S. 795. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956

75) Carroll, K.K.: Canad.J.Biochem.Physiol. 42, 71 (1964)

76) Carroll, K.K., Canad.J.Biochem.Physiol. 38, 649 (1960); 42, 79 (1964)

77) Portman, O.W. u. G.V. Mann: J.Biol.Chem. 213, 733 (1955)

78) Portman, O.W., G.V. Mann u. A.P. Wysocki: Arch.Biochem.Biophys. 59, 224 (1955)

79) Portman, O.W., u. P. Murphy: Arch.Biochem.Biophys. 76, 367 (1958)

80) Coleman, D.L., u. C.A. Baumann: Arch.Biochem.Biophys. 66, 226 (1957)

81) Siperstein, M.D., I. L. Chaikoff u. W.O. Reinhardt: J.Biol.Chem. 198, 111 (1952)

82) Tennent, D.M., H.Siegel, M.E. Zanetti, G.W. Kuron, W.H. Ott und F.J. Wolf: J.Lipid Res. 1, 469 (1960)

83) Tennent, D.M., S.A. Hashim u. T.B. Van Itallie: Feder.Proc. 21, 77 (1962)

84) Huff, J.W., J.F. Gilfillan u. V.M. Hunt: Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 114, 352 (1963)

85) Hill, R., W.W. Wbster, J.M. Linazasoro u. I.L. Chaikoff: J.Lipid.Res. 1, 150 (1960)

86) Linazasoro, J.M., R. Hill, F.Chevallier und I.L. Chaikoff: J.Exptl.Med. 107, 813 (1958)

87) Wood, J.D., u. B.B. Migicovsky: Canad. J.Biochem.Physiol. 36, 433 (1958)

88) Diller, E.R., u. O.A. Harvey: Biochemistry 3, 2004 (1964)

89) Portman, O.W., u. F.J. Stare: Physiol.Reviews 39, 407 (1959)

90) Pitot, H.C., u. C. Peraino: J.Biol.Chem. 239, 1783 (1964)

91) Yarmolinsky, M.B., u. G.L. De la Haba: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 45, 1721 (1959)

92) Pitot, H.C., Van R. Potter u. H.P. Morris: Cancer Res. 21, 1001 (1961)

93) Holzer, H., M. Boll u. C. Cennamo: Angew.Chem. 75, 894 (1963)

94) Weber, G., R.L. Singhal, N.B. Stamm u. S.K. Srivastava: Feder.Proc. 24, 745 (1965)

95) Eggerer, H., u. F. Lynen: Justus Liebigs Ann.Chem. 608, 71 (1957)

96) Wolf, D.E., C.H. Hoffman, P.E. Aldrich, H.R. Skeggs, L.D. Wright u. K. Folkers: J.Amer.Chem.Soc. 79, 1486 (1957)

97) Hoffman, C.H., A.F. Wagner, A.N. Wilson, E. Walton, C.H. Shunk, D.E. Wolf, F.W. Holly u. K. Folkers: J.Amer.Chem.Soc. 79, 2316 (1957)

98) Isler, O., R. Rüegg, J. Würsch, K.F. Gey u. A. Pletscher: Helv.Chim.Acta 40, 2369 (1957)

99) Cornforth, J.W., R.H. Cornforth, G. Popják u. I. Youhotsky-Gore: Biochem.J. 69, 146 (1958)

100) Eberle, M., u. D. Arigoni: Helv.Chim.Acta 43, 1508 (1960)

101) Lynen, F., u. M. Graßl: Z.Physiol.Chem. 313, 291 (1958)

102) Ferguson, J.J., jr., I.F. Durr u. H.Rudney: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 45, 499 (1959)

103) Kröper, H., in Houben-Weyl: Methoden der organ.Chemie, VI, Teil 2, S. 563. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1963

104) Kailan, A.: Z.f.Physikal.Chem. 101, 63 (1922)

105) Hestrin, S.: J.Biol.Chem. 180, 249 (1949)

106) Linstead, R.P., u. H.N. Rydon: J.Chem.Soc. (London) 1933, 580

107) Johnson, W.S., J.W. Petersen u. W.P. Schneider: J.Amer.Chem.Soc. 69, 74 (1947)

108) Billeter, J.R. u. K. Miescher: Helv.Chim.Acta 31, 1302 (1948)

109) Spencer, E.Y. u. G.F. Wright: J.Amer.Chem.Soc. 63, 2017 (1941)

110) Kirschner, K.: Diplomarbeit. Universität München 1958

111) Lynen, F., u. B. Hamprecht: Unveröffentlichte Versuche

112) Keller-Schierlein, W.: Helv.Chim.Acta 46, 1920 (1963)

113) Keller-Schierlein, W., H. Zähner, V. Pünter-Streit u. H. Bär: Biochem. Z. 341, 378 (1965)

114) Guchhait, R.B., u. J.W. Porter: Analyt.Biochem. 15, 509 (1966)

115) Hinse, C.M., u. P.J. Lupien: Analyt. Biochem. 19, 392 (1967)

116) Dalgliesh, C.E., E.C. Horning, M.G. Horning, K.L. Knox u. K. Yarger: Biochem.J. 101, 792 (1966)

117) Suzue, G., H. Morishima u. S. Tanaka: Nippon Kagaku Zasshi 85, 375 (1964)

118) NMR-Spectra Catalog II, Spektrum Nr. 466, Varian Associates 1963

119) Linn, T.C.: J.Biol.Chem. 242, 984 (1967)

120) Karmen, A., I. McCaffrey u. R.L. Bowman: J.Lipid Res. 3, 372 (1962)

121) Himes, R.H., D.L. Young, E. Ringelmann u. F. Lynen: Biochem.Z. 337, 48 (1963)

122) Hilz, H., J. Knappe, E. Ringelmann u. F. Lynen: Biochem.Z. 329, 476 (1958)

123) Lynen, F., J. Knappe, E. Lorch, G. Jütting, E. Ringelmann u. J.-P. Lachance: Biochem. Z. 335, 123 (1961)

124) Feist, F.: Justus Liebigs Ann.Chem. 345, 60 (1906)

125) Fraser, R.R., u. D.E. McGreer: Canad.J.Chem. 39, 505 (1961)

126) Panse, P.: Dissertation. Universität München 1965

127) Jackman, L.M., u. R.H. Wiley: J.Chem.Soc. (London) 1960, 2886

128) Knappe, J., in H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, S. 445. Verlag Chemie, Weinheim 1962

129) Buckel, W. u. H. Eggerer: Biochem.Z. 343, 29 (1965)

130) Wells, W.W., u. M.Makita: Analyt.Biochem. 4, 204 (1962)

131) Wells, W.W., T. Chin u. B. Weber: Clin.Chim.Acta 10, 352 (1964)

132) Klebe, J.F., H. Finkbeiner u. D.M. White: J.Amer.Chem.Soc. 88, 3390 (1966)

133) Theilacker, W., K.-H. Bremer u. L. Seidl: Angew.Chem. 76, 376 (1964)

134) Kaiser, R.: Chromatographie in der Gasphase IV, S. 111, Bibliographisches Institut, Mannheim 1965

135) Dekker, E.E., M.J. Schlesinger u. M.J. Coon: J.Biol.Chem. 233, 434 (1958)

136) Walker, P.G.: Biochem.J. 58, 699 (1954)

137) Bachhawat, B.K., W.G. Robinson u. M.J. Coon: J.Biol.Chem. 216, 727 (1955)

138) Lineweaver, H., u. D. Burk: J.Amer.Chem.Soc. 56, 658 (1934)

139) Rétey, J., U.Coy u. F. Lynen: Unveröffentlichte Versuche

140) Bucher, N.L.R., in G.E.W. Wolstenholme u. M. O'Connor: Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols, S. 49. Little, Brown & Co., Boston 1959

141) Day, A.J., N.H. Fidge u. G.N. Wilkinson: J. Lipid.Res. 7, 132 (1966)

142) Linn, T.C: J.Biol.Chem. 242, 990 (1967)

143) Dawson, R.M.C., in P.N. Campbell u. G.D. Greville: Essays in Biochemistry II, 69 (1966)

144) Brodie, J.D., G. Wasson u. J.W. Porter: J.Biol.Chem. 239, 1346 (1964)

145) Aschoff, J., in W.H. Weihe: Die Umwelt der Versuchstiere und ihre Standardisierung im biologischen Test. Beiheft zur Int.Z.f.Vitaminforschung 9, 43 (1966)

146) Van Potter, R., R.A. Gebert u. H.C. Pitot: Advances Enzyme Regul. 4, 247 (1966)

147) Civen, M., R. Ulrich, B.M. Trimmer u. C.B. Brown: Science 157, 1563 (1967)

148) Bremer, J.: Biochem.J. 63, 507 (1956)

149) Goodman, D.S.: J.Amer.Chem.Soc. 80, 3892 (1958)

150) Dixon, M., u. E.C. Webb: Enzymes, S. 114, Longmans, London 1964

151) Medes, G., M.A. Spirtes u. S. Weinhouse: J.Biol.Chem. 205, 401 (1953)

152) Scaife, J.F., u. B.B. Migicovsky: Canad. J.Biochem.Physiol. 35, 615 (1957)

153) Artman, M., A. Bekierkunst u. E. Barkai: Biochim.Biophys.Acta 81, 614 (1964)

154) Miller, W.L., u. J.L. Gaylor: Biochim. Biophys. Acta 137, 400 (1967)

155) Hess, E.L., u. S.E. Lagg: Biochem.Biophys.Res.Comm. 12, 320 (1963)

156) Segal, H.L., u. M.E. Washko: J.Biol.Chem. 234, 1937 (1959)

157) Jacobs, E.E., F.H. Kirkpatrick, jr., u. E.C. Andrews: Biochem.Biophys.Res.Comm. 25, 96 (1966)

158) Berlin, C.M., u. R.T. Schimke: Molecular Pharmacology 1, 149 (1965)

159) Kenney, F.T.: J.Biol.Chem. 237, 3495 (1962)

160) Schimke, R.T.: J.Biol.Chem. 239, 3808 (1964)

161) Feigelson, P., T. Dashman u. F. Margolis: Arch.Biochem.Biophys. 85, 478 (1959)

162) Omura, T., P. Siekevitz u. G.E. Palade: J.Biol.Chem. 242, 2389 (1967)

163) Treadwell, C.R., L. Swell u. G.V. Vahouny: Feder.Proc. 21, 903 (1962)

164) Shah, S.N., W.J. Lossow u. I.L. Chaikoff: J.Lipid.Res. 6, 228 (1965)

165) Stirpe, R., u. E. Della Corte: Biochem.J. 94, 309 (1965)

166) Roberts, K.D., L. Bandi, H.I. Calvin, W.D. Drucker u. S. Lieberman:Biochemistry 3, 1983 (1964)

167) Moser, H.W., A.B. Moser u. J.C. Orr: Biochim.Biophys.Acta 116, 146 (1966)

168) Gurpide, E., K.D. Roberts, M.T. Welch, L. Bandi u. S. Lieberman: Biochemistry 5, 3352 (1966)

169) Fujiwara, T., H. Hirono u. T. Arakawa: Tohoku J.Exptl.Med. 87, 155 (1965)

170) Pronczuk, A.-W., u.L.C. Fillios: Feder.Proc. 26, 409 (1967)

171) Azarnoff, D.L.: Feder.Proc. 26, 400 (1966)

172) Conney, A.H., E.C. Miller u. J.A. Miller: J.Biol.Chem. 228, 753 (1957)

173) Ernster, L., u. S. Orrenius: Feder.Proc. 24, 1190 (1965)

174) Conney, A.H. u. J.J. Burns: Nature 184, 363 (1959)

175) Gelboin. H.V., u. N.R. Blackburn: Biochim.Biophys.Acta 72, 657 (1963)

176) Shuster, L., u. H. Jick: J.Biol.Chem. 241, 5366 (1966)

177) Dallner, G., P. Siekevitz u. G.E. Palade: Biochem.Biophys.Res.Comm. 20, 135 (1965)

178) Greengard, O., u. P. Feigelson: J.Biol.Chem. 236, 158 (1961); 237, 1903 (1962)

179) Feigelson, P., u. O. Greengard: J.Biol.Chem. 237, 1908 (1962); 237, 3714 (1962)

180) Schimke, R.T., E.W. Sweeney u. C.M. Berlin: J.Biol.Chem. 240, 322 (1965)

181) Lynen, R., U. Henning, C. Bublitz, B. Sörbo u. L. Kröplin-Rueff: Biochem.Z. 330, 269 (1958)

182) Brock, N., u. W. Wilk: Arzneimittelforschung 11, 1071 (1961)

183) Umbreit, W.W., R.H. Burris u. J.F. Stauffer: Manometric Techniques, S. 149. Burgess Publishing Co., Manneapolis 1959

184) Warburg, O.: Biochem.Z. 142, 317 (1923)

185) Organic Synthesis, Coll. Vol. II, 165 (1943)

186) Organic Synthesis, Coll. Vol. IV, 549 (1963)

187) Linstead, R.L., u. A.F. Millidge: J.Chem.Soc. 1936, 478

188) Grubhöfer, N., in H.M. Rauen: Biochem. Taschenbuch, Bd. II, S. 821. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964

189) Gornall, A.G., C.J. Bardawill u. M.M. David: J.Biol.Chem. 177, 751 (1949)

190) Burchfield, H.P., u. E.E. Storrs: Biochem.Applications of Gaschromatography, S. 17. Academic Press, New York 1963

191) Ljunggren, G.: Biochem.Z. 145, 422 (1924)

192) Edson, N.L.: Biochem.J. 29, 2082 (1935)

193) Mellanby, J., u. D.H. Williamson, in H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, S. 454. Verlag Chemie, Weinheim 1962

194) Warburg, O., u. W. Christian: Biochem.Z. 310, 384 (1942)

195) Eneroth, P.: J.Lipid.Res. 4, 11 (1963)

196) Hofmann, A.F.: J.Lipid.Res. 3, 127 (1962)

197) Norman, A.: Arkiv f.Kemi 8, 331 (1956)

198) Norman, A.: Acta Chem.Scand. 7, 1413 (1953)

199) Howard, G.A., u.A.J.P. Martin: Biochem.J. 46, 532 (1950)

200) Biochemica Information, C.F. Boehringer und Söhne, Mannheim 1961.

Lebenslauf

Am 7. März 1939 wurde ich als Sohn des Gartenmeisters Emil Hamprecht und seiner Frau Else geb. Heck in Bad Godesberg geboren. Von 1945 bis 1948 besuchte ich die Volksschule in Börtlingen, Kreis Göppingen/Württ. und anschließend sechs Jahre lang das Göppinger Hohenstaufen-Gymnasium. 1954 mußte ich aus Gründen, die daraus resultierten, daß mein Vater 1947 aus russischer Gefangenschaft schwerkriegsbeschädigt zurückgekehrt und nicht arbeitsfähig war, das Gymnasium verlassen. Nach zweijähriger Ausbildung zum Chemotechniker am Chemischen Institut Dr. Flad in Stuttgart trat ich in die Farbwerke Hoechst A.G. in Frankfurt a.M.-Hoechst ein, um in diesem Beruf zu arbeiten. Ab 1958 besuchte ich Abendkurse zur Vorbereitung auf die Nichtschüler-Reifeprüfung. Als dieser Tageslauf zu anstrengend wurde, verließ ich die Farbwerke und verdiente meinen Unterhalt durch Erteilen von Nachhilfestunden und durch Arbeit in einem Übersetzungsbüro. Später erhielt ich ein Stipendium der Walter-Kolb-Stiftung, das mir eine ruhigere Vorbereitung auf die Reifeprüfung im April 1960 ermöglichte. Als ich die einjährige Dienstzeit als Soldat der Bundeswehr bei einem Panzerartillerie-Bataillon der Gebirgstruppe in Füssen absolviert hatte, konnte ich im Mai 1961 – kurz nach dem Tod meines Vaters – mit dem Chemiestudium an der TH Stuttgart beginnen. Nach der Diplomvorprüfung im Sommersemester 1962 setzte ich mein Studium an der Universität München fort und legte im Februar 1964 das Diplomhauptexamen ab. Von September 1964 bis September 1967 führte ich am Biochemischen Institut der Universität unter Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen vorliegende Diplom- und Doktorarbeit aus. Ein Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes seit April 1962 erleichterte mein Studium sehr.